

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C07K 14/47, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/18, A61K 38/17	A1	(11) 国際公開番号 <b>WO99/48920</b> (43) 国際公開日 1999年9月30日(30.09.99)
---	----	--

(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01482	(22) 国際出願日 1999年3月24日(24.03.99)	(30) 優先権データ 特願平10/78139 特願平10/266972	(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)	(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 大瀧徹也(OHTAKI, Tetsuya)[JP/JP] 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9-802号 Ibaraki, (JP)	(74) 代理人 弁理士 朝日奈忠夫, 外(ASAHIWA, Tadao et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)
(77) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)	(78) 添付公開書類 国際調査報告書				

(54)Title: NOVEL PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES AND UTILIZATION THEREOF

(54)発明の名称 新規生理活性ペプチドおよびその用途

## (57) Abstract

Peptides having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:35 or an amino acid sequence substantially identical therewith and being capable of binding to receptor proteins having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 or an amino acid sequence substantially identical therewith, precursors thereof or amides, esters or salts of the same. DNAs, etc. encoding the above peptides are usable in: 1) developing receptor-binding assay systems with the use of recombinant receptor protein expression systems and screening of candidates for drugs; 2) developing drugs such as memory function improving agents, appetite improving agents or function regulating agents for uterus, kidney, prostate gland, testis or skeletal muscle; etc.

本発明は、配列番号：35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、かつ配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に結合する能力を有するペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に関する。

本発明ペプチドをコードするDNA等は、①組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、②副作用の少ない、記憶機能改善剤、食欲改善剤または子宮、腎臓、前立腺、精巣もしくは骨格筋における機能調節剤などの医薬の開発等に用いることができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スードアン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロ伐キア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英國	LT	リトアニア	SL	シェラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジラント
BF	ブルギナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガムビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	共和国		TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダッド・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴィエトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴースラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

## 新規生理活性ペプチドおよびその用途

## 5 技術分野

本発明は、ガラニン・レセプターに対する活性化因子（リガンドペプチド等）に関する。

## 背景技術

ガラニン(galanin)は、ブタ小腸抽出液中に最初に見出された29アミノ酸残基からなる  
10 生理活性ペプチドであり〔フェブス・レター (FEBS Lett.) , 164, pp124-128 (1983)〕、ブ  
タ以外にも、多くの哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類にわたって見出されている。ガラニンのア  
ミノ酸配列は、ヒト(FEBS Lett., 283, pp189-194 (1991))、ウシ(FEBS Lett., 234, pp400-406  
(1988))、ラット(J. Biol. Chem., 262, pp 16755-16758 (1987))、ヒツジ(Peptides, 12,  
pp855-859 (1991))などで報告されており、N末端からの15アミノ酸残基は種間で保存され  
15 ている。

ブタ・ガラニンには、123アミノ酸残基からなる前駆体蛋白質 (preprogalanin(1-123) ;  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, pp6287-6291 (1986))、また、ガラニンに比べてN端に  
9 残基長い前駆体 preprogalanin(24-61) amide、ガラニンのN端4残基を欠落した  
preprogalanin(37-61) amideが知られている(Peptides, 13, pp1055-1060 (1992))。

20 ガラニンの生理作用としては、脳海馬でのアセチルコリン遊離阻害作用 (Brain Research,  
709, pp81-87 (1996))、脳視床下部での節食中枢促進作用 (Obesity Research, 3, pp5735-5895  
(1995))、脳下垂体での下垂体ホルモン放出促進作用 (Neuroscience Letter, 75, pp49-54  
(1987); Endocrinology, 134, pp529-536 (1994); Peptides, 7, pp51-53, (1986))、臍臓  
でのインスリン分泌阻害作用 (Acta Physiol. Scand., 139, pp591-596 (1990)) などが知ら  
25 れており、その生理作用はガラニンレセプターを介して発揮されるものと考えられている。

ガラニン・レセプターには、3種類のサブタイプ (GALR1、GALR2、GALR3) が存在しており

、GALR1 についてはヒト、ラットおよびマウス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, pp3845-3849 (1993); J. Mol. Neurosci., 6, pp33-41 (1995); FEBS Lett., 411, pp225-230 (1997)) 、  
GALR2 についてはラット (FEBS Lett., 405, pp285-290 (1997); Mol. Pharmacol., 52, pp337-343 (1997); J. Biol. Chem., 272, pp24612-24616 (1997)) 、GALR3 についてはラッ  
5 ツ (J. Biol. Chem., 272, pp31949-31952 (1997)) の各遺伝子がクローニングされている。ま  
た、これら 3 種類のガラニン・レセプターは、G タンパク質共役型レセプターに特徴的な 7  
個の疎水的領域（膜貫通ドメイン）を有しており、G タンパク質を活性化することにより細  
胞内情報伝達系を刺激するものと考えられる。

ガラニンは、これら 3 種類のいずれのサブタイプのガラニン・レセプターとも結合するこ  
10 とが確認されている。ガラニンの結合親和性は GALR1 に対して最も強く、次いで GALR2、GALR3  
の順に強く、GALR3 に対する親和性は GALR1 に対する親和性に比べて約 10 倍弱い (J. Biol.  
Chem. 272, 31949-31952, 1997)。また、ガラニンは、GALR1 発現細胞では cAMP の產生阻害  
を引き起こすこと (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3845-3849, 1993) 、GALR2 発現細胞  
では cAMP の產生阻害を引き起こすこと (Mol. Pharmacol., 52, pp337-343 (1997)) 、イノ  
15 シトール・りん酸代謝系の亢進や細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こすこと (J.  
Biol. Chem. 272, 24612-24616, 1997) が報告されている。

現在までのところ、ガラニン・レセプターに対する内因性アゴニストとしては、ガラニン  
しか見出されていない。また、ガラニン・レセプターにおけるアゴニスト依存的な G タンパ  
ク質（G 蛋白共役型レセプター蛋白質）活性化反応、例えば  $^{35}$ S 標識グアノシン-5'-0-3-  
20 チオ三りん酸 ( $[^{35}$ S]GTPgS) 結合量増加反応 (Methods in Enzymology, 237, pp3-13 (1994)  
) あるいは GTP の水解促進反応 (Methods in Enzymology 237, 13-26, 1994) などの方法を  
、ガラニン・レセプターのリガンド探索に使用することについては報告はない。

ガラニン・レセプターのサブタイプに対する選択性（特異性）がガラニンとは異なる新たな  
内因性アゴニストを見出すことが望まれている。

本発明者らは、ガラニン・レセプターGALR2 発現細胞およびガラニン・レセプターGALR1 発現細胞を構築し、これらを用いることにより、ガラニン・レセプターのそれぞれのサブタイプに対するアゴニスト活性を測定する簡便なアッセイ法、即ち、[<sup>35</sup>S]GTP γ S 結合試験法を完成した。このアッセイ法により、GALR2 アゴニストをスクリーニングした結果、  
5 ガラニン・レセプターのそれぞれのサブタイプに対する活性化作用がガラニンとは異なる新規活性化因子を見出すことに成功した。さらに、本発明者らは、この知見に基づきこの新規活性化因子とガラニン・レセプターとの結合性を変化させる化合物のスクリーニングが可能であることを見出した。

すなわち、本発明は、

10 (1) 配列番号：35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、かつ配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に結合する能力を有するペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩  
15 (2) 配列番号：35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、かつ配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質を活性化する能力を有する上記（1）記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、  
20 (3) 配列番号：36で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、  
25 (4) ペプチドが、配列番号：11..12..15..16または4..3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである上記（1）または上記（3）記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(5) ペプチドが、配列番号：11、12、15、16または43で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有し、分子量が5000～10000であるペプチドである上記（1）または上記（3）記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

5 (6) ペプチドが配列番号：31、33または34で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドである上記（1）または上記（3）記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(7) 前駆体が配列番号：29で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドである上記（1）または上記（3）記載のペプチドの前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(8) 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：30、37または38で表されるアミノ酸配列である上記（6）記載のペプチドの前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(9) 上記（1）または上記（3）記載のペプチドをコードする塩基配列を含有するDNA  
15 を含有するDNA、

(10) 配列番号：31、33または34で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドをコードする上記（9）記載のDNA、

(11) 配列番号：32、39または40で表される塩基配列を有する上記（10）記載のDNA、

20 (12) 配列番号：29、30、37または38で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する上記（1）または上記（3）記載のペプチドの前駆体をコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNA、

(13) 配列番号：27、28、41または42で表される塩基配列を含有するDNAを含有する上記（12）記載のDNA、

25 (14) 上記（9）記載のDNAを含有する組換えベクター、

(15) 上記（14）記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(16) 上記(15)記載の形質転換体を培養し、上記(1)または上記(3)記載のペプチドを生成せしめることを特徴とする上記(1)または上記(3)記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

(17) 上記(1)または上記(3)記載のペプチドまたはその前駆体に対する抗体、

5 (18) 上記(17)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(19) 上記(1)または上記(3)記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、

(20) 記憶機能改善剤、食欲調節剤、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤、精巣機能調節剤または骨格筋機能調節剤である上記(19)記載の医薬、

10 (21) 上記(1)または上記(3)記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：1、2または3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタ一蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、および

(22) 上記(21)記載のスクリーニング方法によって得られる化合物またはその塩など

15 に関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は $[^{35}\text{S}]GTP\gamma S$ 結合試験によるガラニン・レセプター活性化作用の検出結果を示す。

20 図2は実施例2(2-3)で得られたサンプル・フラクションのGALR2発現細胞膜画分を用いた $[^{35}\text{S}]GTP\gamma S$ 結合試験結果を示す。

図3は実施例2(2-3)で得られたサンプル・フラクションのブタ・ガラニン・ラジオイムノアッセイキット(Peninsula社)による分析結果を示す。

25 図4は実施例2(2-4)で得られたGALR2活性化作用( $[^{35}\text{S}]GTP\gamma S$ 結合促進活性)を有する成分のゲルろ過高速液体クロマトグラフィー法による分子量解析結果を示す。

図5は実施例2(2-4)における、公知のペプチドのゲルろ過高速液体クロマトグラフ

イー法による分子量解析結果を示す。

図6は本発明ペプチドとガラニン前駆体のアミノ酸配列における比較を示す。

図7は Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys(-NH<sub>2</sub>) - K L H複合体を免疫したマウスの抗体価をH R P標識化 Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub>を用いて調べた  
5 結果を示す。

図8は Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys(-NH<sub>2</sub>) - K L H複合体を免疫したマウスを用いた場合の細胞融合後のハイブリドーマのスクリーニングの典型例を示す。

図9は Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys(-NH<sub>2</sub>) - K L H複合体を免疫原として作製したモノクローナル抗体G R 2 - 1 Nの Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-  
10 NH<sub>2</sub> (配列番号: 44のアミド体)、ブタ型リガンドペプチド (1 - 60) (配列番号: 31 ) およびラットガラニン (配列番号: 61) に対する反応性をH R P標識化 Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub>を用いる競合法-E I Aで調べた結果を示す。

図10は実施例20に記載のブタ型リガンドペプチドの構造遺伝子の調製法に関する図を示す。

15 図11は実施例21に記載の融合蛋白質発現用ベクターの構築図を示す。

図12は実施例21に記載のブタ型リガンドペプチド発現株の構築図を示す。

図13は実施例23に記載の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析結果(電気泳動図)を示す。

図14は実施例24で行われた摂食試験の結果を示す図を示す。

20

### 発明を実施するための最良の形態

本明細書において、「実質的に同一」とは蛋白質の活性、例えばレセプターに対するアゴニスト活性、即ち、リガンドの有するレセプターを活性化させる活性、リガンドのレセプターへの結合活性などが、実質的に同じことを意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入は、しばしばペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさないが、こうした場合その置換、欠失、付加あるいは挿入を施されたペプチドは、こうした置換、  
25

欠失、付加あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされるであろう。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、例えば、そのアミノ酸が属するクラスのうちの他のアミノ酸類から選ぶことができる。非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどがあげられる。極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどがあげられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどがあげられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などがあげられる。

5 本発明のペプチドは、ガラニンレセプターに対して結合能を有するペプチドである。好ましくはガラニンレセプターに対する活性化作用を有し、公知のガラニン以外のリガンドペプチドである。なお、ガラニンレセプターについては後述のとおりである。

10 本発明のペプチドとしては、例えば、配列番号：35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列（例えば、配列番号：13など）を含有し、かつ配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に対する結合する能力（好ましくはレセプター蛋白質を活性化する能力など）を有するペプチド、具体的には、

15 (I) 配列番号：35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列（例えば、配列番号：13など）を含有し、かつ配列番号：11、配列番号：12、配列番号：15、配列番号：16または配列番号：43で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、かつ配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に対する結合する能力（好ましくはレセプター蛋白質を活性化する能力など）を有するペプチド、

20 (II) 分子量が5000～10000である上記(I)記載のペプチド、  
25 (III) 分子量が5000～8000である上記(I)記載のペプチド、  
(IV) 配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配

列を有し、かつ配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に対する結合する能力（好ましくはレセプター蛋白質を活性化する能力など）を有し、さらに分子量が5000～10000であるペプチド、

5 (V) 配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有し、かつ配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に対する結合する能力（好ましくはレセプター蛋白質を活性化する能力など）を有するペプチドなどがあげられる。

10 さらに、本発明のペプチドとしては、例えば、

(VI) 配列番号：36で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、

15 (VII) 配列番号：11、配列番号：12、配列番号：15、配列番号：16または配列番号：43で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する上記(VI)記載のペプチド、

(VIII) 分子量が5000～10000である上記(VII)記載のペプチド、

(IX) 分子量が5000～8000である上記(VII)記載のペプチド、

(X) 配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、

20 (XI) 配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、

(XII) 配列番号：35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列（例えば、配列番号：13など）を含有し、かつ配列番号：11、配列番号：12、配列番号：15、配列番号：16または配列番号：43で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、

(XIII) 分子量が5000～10000である上記(X)～(XII)記載のペプチド、

本発明のペプチド、その製造法および用途を以下にさらに詳細に説明する。

本発明の上記ペプチドの由来は特に限定されないが、例えば、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の組織（例えば、下垂体、臍臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、5 血管、心臓、精巣など）または細胞などに由来するペプチドであってもよく（例えば、マウス脳、ラット脳、ブタ脳、ウシ脳、ブタ視床下部、ウシ視床下部、ブタ肺、ウシ肺、ウシ胃、ヒト視床下部、ブタ精巣、ウシ精巣、ラット精巣、ヒト精巣またはヒト肺由来のものが好ましい）、また合成ペプチドであってもよい。

例えば、本発明のペプチドとしては、

10 ①配列番号：1 7、配列番号：3 1、配列番号：3 3 または配列番号：3 4（好ましくは、配列番号：3 1、配列番号：3 3 または配列番号：3 4）で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドなどの他に、配列番号：1 7、配列番号：3 1、配列番号：3 3 または配列番号：3 4（好ましくは、配列番号：3 1、配列番号：3 3 または配列番号：3 4）で表わされるアミノ酸配列と約50～99. 9%（好ましくは70～99. 9%、より好ましくは15 80～99. 9%、さらに好ましくは90～99. 9%、最も好ましくは95～99. 9%）の相同性を有するアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチド（ただし、配列番号：7, 8, 9もしくは10で表されるガラニンまたはその前駆体の配列を除く）などがあげられる。

「実質的に同質の活性」としては、例えばガラニン・レセプターGALR1、GALR2 または GALR3 20 に結合する活性、ガラニン・レセプターGALR1、GALR2 または GALR3 を活性化する活性、またはそれに伴い引き起こされるアラキドン酸遊離、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離、細胞内 cAMP 生成阻害、イノシトールリン酸産生（阻害）、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質の磷酸化、細胞内 pH の変化などのシグナル伝達活性系を活性化させる能力において同質であることを示す。従って、これら活性の強弱やペプチドの分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

25 本発明のペプチドとして具体的には、次のようなものがあげられる（ただし、配列番号：7, 8, 9もしくは10で表されるアミノ酸配列を有するガラニンまたはその前駆体を除く

)。

(I) 配列番号：17、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34（好ましくは、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34）で表わされるアミノ酸配列もしくはその部分配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス脳、ラット脳、ブタ脳、ウシ脳、ブタ視床下部、ウシ視床下部、ブタ肺、ウシ肺、ウシ胃、ヒト視床下部、ブタ精巣、ウシ精巣、ラット精巣、ヒト精巣またはヒト肺由来のペプチド。

(II) 配列番号：17、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34（好ましくは、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34）で表されるアミノ酸配列もしくはその部分配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドもしくはその部分ペプチドに対して、1もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加あるいは挿入されているアミノ酸配列を含有するペプチドは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしてあげられる。例えば、(1) 配列番号：17、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34（好ましくは、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34）で表されるアミノ酸配列もしくはその部分配列中の1個以上7個以下、好ましくは1個以上5個以下、より好ましくは1個以上3個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2) 配列番号：17、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34（好ましくは、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34）で表されるアミノ酸配列もしくはその部分配列に1個以上20個以下、好ましくは1個以上15個以下、より好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加した（または挿入された）アミノ酸配列、(3) 配列番号：17、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34（好ましくは、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34）で表されるアミノ酸配列もしくはその部分配列中の1個以上7個以下、好ましくは1個以上5個以下、より好ましくは1個以上3個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。

「実質的に同質のアミノ酸配列」としては、その配列と70～99.9%、より好ましく

は80～99.9%、さらに好ましくは90～99.9%、最も好ましくは95～99.9%の相同性を有するアミノ酸配列があげられる。

本発明のペプチドの分子量は、ゲルろ過クロマトグラフィー法等で測定する場合、約5000～約10000ダルトン、好ましくは約5000～約8000ダルトン、より好ましくは約5500～約8000ダルトン、さらに好ましくは約6000～約7000ダルトンである。  
5

本明細書におけるペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。

本発明のペプチドは、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソブロピルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、フェニル、α-ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル、もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキルなどのC<sub>7-14</sub>アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などがあげられる。  
10  
15

本発明のペプチドがC末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレートを有している場合、それらの基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルと同様なエステルなどが用いられる。  
20

本発明のペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。  
25

本発明のペプチドは、ヒトや温血動物の組織または細胞からペプチドを精製する方法によつて製造することもできるし、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

また、本発明のペプチドは、それをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによつても製造することができる。該ペプチドをコードするDNAは、公知のクローニング方法〔例えば、Molecular Cloning (2nd ed. ; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法など〕に従つて作成することができる。

該クローニング方法とは、(1) 該ペプチドのアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプローブまたはDNAプライマーを用い、cDNAライブラリーからハイブリダイゼーション法により該ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法、または(2) 10 該ペプチドのアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプライマーを用い、PCR法により該ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法があげられる。

本発明のペプチドをヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸、またはアルコールなどで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、15 アフィニティーコロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

上記したように本発明のペプチドは、(1) 自体公知のペプチドの合成法に従つて、または(2) 本発明のペプチドを含有するペプチドを適當なペプチダーゼで切断することによつて製造することができる。

20 ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによつても良い。すなわち、本発明のペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～②に記載された方法があげられる。

25 ① M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチドシンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)

② Schroeder および Luebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて本発明のペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM 樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル) フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc アミノエチル) フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のペプチドを取得する。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル) カルボジイミドなどがあげられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBT、HOOBt など）とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物または HOBT エステルあるいは HOOBt エステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜

選択されうる。たとえばN, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20°C～約50°Cの範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常約1.5ないし約4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどがあげられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばRとして上記したC<sub>1-6</sub>アルキル基、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、C<sub>7-14</sub>アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどがあげられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級(C<sub>1-6</sub>)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などがあげられる。また、エーテル化に適す

る基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえば Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどがあげられる。

5 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmoc などがあげられる。

原料のカルボキシリル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル [アルコール (たとえば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBT) とのエステル] などがあげられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドがあげられる。

保護基の除去 (脱離) 方法としては、たとえば Pd 黒あるいは Pd 炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元などもあげられる。上記酸処理による脱離反応は一般に -20℃～40℃ の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる 2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の 1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

25 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

本発明のペプチドのアミド体を得る別 の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。  
5 縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明のペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチドのアミド体と同様にして所望のペプチドのエステル体を得ることができる。  
10

本発明のペプチドとしては、上記した配列番号：17、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34（好ましくは、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34）で表されるアミノ酸配列もしくはその部分配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドと同様の作用（例、GALR1 アゴニスト活性、GALR2 アゴニスト活性またはGALR3 アゴニスト活性など）を有しているものであれば、どのようなペプチドであってよい。このようなペプチドとしてはたとえば、上記した配列番号：17、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34（好ましくは、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：34）で表されるアミノ酸配列もしくはその部分配列、から1ないし5個  
15 以下のアミノ酸が欠失、付加（挿入）または置換したアミノ酸配列を有するペプチドをあげることができる。  
20

本発明のペプチドの前駆体とは、本発明のリガンドペプチドをその部分配列としてコードするペプチド（ただし、配列番号：7、8、9もしくは10で表されるアミノ酸配列を有するガラニンまたはその前駆体を除く）であればいかなるものであってよい。

25 本発明のペプチドの前駆体として、具体的には、例えば、配列番号：29で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド（またはポリペプ

チド) などがあげられる。

ここで、「実質的に同一のアミノ酸配列」としては、配列番号：29で表されるアミノ酸配列と70～99.9%、より好ましくは80～99.9%、さらに好ましくは90～99.9%、最も好ましくは95～99.9%の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる

5 .

また、「実質的に同一のアミノ酸配列」としては、(i)配列番号：29で表されるアミノ酸配列中の1個以上7個以下、好ましくは1個以上5個以下、より好ましくは1個以上3個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(ii)配列番号：29で表されるアミノ酸配列中の1個以上7個以下、好ましくは1個以上5個以下、より好ましくは1個以上3個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(iii)配列番号：29で表されるアミノ酸配列に1個以上7個以下、好ましくは1個以上5個以下、より好ましくは1個以上3個以下のアミノ酸が付加（または挿入）したアミノ酸配列などがあげられる。「置換、欠失、付加（または挿入）」の位置は本発明のリガンドペプチドをその部分配列としてコードする領域以外であれば、特に限定はされない。

10

15

配列番号：29で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド（またはポリペプチド）の具体例としては、例えば、

(1) 配列番号：30で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド（またはポリペプチド）、

20

(2) 配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド（またはポリペプチド）、または

(3) 配列番号：38で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド（またはポリペプチド）などがあげられる。

25

本発明のペプチドは、さらに抗リガンドペプチド抗体の調製のための抗原として用いることができる。このような抗原としてのペプチドは上記した本発明のペプチドの他に、例えば、上記本発明のペプチドのN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドなどが用いられる。

部分ペプチドとしては、本発明ペプチドの個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

また、上記の部分ペプチドは、抗リガンドペプチド抗体の調製のための抗原として用いることができればよいため、(i)上記本発明のペプチドのN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドに1ないし数個(好ましくは1ないし3個、より好ましくは1または2個)の他のアミノ酸残基が付加(または挿入)した部分ペプチド、(ii)上記本発明のペプチドのN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドから1ないし数個(好ましくは1ないし3個、より好ましくは1または2個)のアミノ酸残基が欠失した部分ペプチド、(iii)上記本発明のペプチドのN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドの構成アミノ酸の1ないし数個(好ましくは1ないし3個、より好ましくは1または2個)が他のアミノ酸残基で置換された部分ペプチドなども含まれる。

上記の部分ペプチドとしてより具体的には、例えば、後述の実施例9などで用いられる① Ala Pro Ala His Arg Gly Arg Gly Gly Cys-NH<sub>2</sub> (配列番号：44のアミド体) で表されるアミノ酸配列からなるペプチドがあげられる他、

- ② 配列番号：11で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、
- ③ 配列番号：12で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、
- ④ 配列番号：13で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、
- ⑤ 配列番号：15で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、
- ⑥ 配列番号：16で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、
- ⑦ 配列番号：17で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、
- ⑧ 配列番号：35で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、
- ⑨ 配列番号：36で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、および
- ⑩ 配列番号：43で表されるアミノ酸配列からなるペプチドなどがあげられる。

25 本明細書における部分ペプチドもC末端がアミド(-CONH<sub>2</sub>)またはエステル(-COOR)であつてもよい。ここでエステル基の例としては上記したペプチドの場合と同様である。該部分ペ

ペプチドがC末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレートを有している場合、それらの基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば、上記したC末端のエステルなどが用いられる。

本発明のペプチドの部分ペプチドはそれ自体で本発明のペプチドが有する活性（例えば、

5 ガラニンレセプターに対する活性化作用など）を有していてもよい。

本発明のペプチドまたはその部分ペプチドは、さらに、機能あるいは性質がよく知られているタンパク質との融合タンパク質であってもよい。

該融合タンパク質の具体例としては、例えば、後述の実施例11などで用いられる Ala Pro

Ala His Arg Gly Arg Gly Gly Cys-NH<sub>2</sub>（配列番号：44のアミド体）で表されるアミノ酸配

10 列を含有してなるペプチドと Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) との融合タンパク質などがあげられる。

本発明のペプチドの部分ペプチドの塩としては、前述のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のペプチドの部分ペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩は、上記したペプチドの場合と同様の合成法に従って、あるいは本発明のペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

本発明のペプチドをコードするDNAとしては、(I) 配列番号：35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列（例えば、配列番号：13など）を含有し、かつ配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に対する結合する能力（好みしくはレセプター蛋白質を活性化する能力など）を有するペプチド、または(II) 配列番号：36で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドなどをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。

25 さらには上記に具体的に記載された本発明のペプチドをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAであればいかなるものであっていてもよい。

また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した組織・細胞由来のc DNA、前記した組織・細胞由来のc DNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した組織・細胞よりRNA画分を調製したものを用いて  
5 直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

より具体的には、

(1)配列番号：3 1、配列番号：3 3または配列番号：3 4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNA (2)ストリンジエントな条件下で(1)で規定された配列とハイブリダイズする哺乳動物由来のDNA、(3)遺伝コードの縮重のため(1)および(2)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつポリペプチドをコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じた方法に従って行うことができる。上記ストリンジエントな条件としては、例えば42°C、5  
10 0%ホルムアミド、4×SSPE ( $1 \times$  SSPE = 150mM NaCl, 10mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1mM EDTA pH7.4)、5×デンhardt溶液、0.1% SDSである。

配列番号：3 1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAの具体例としては、配列番号：3 2で表される塩基配列を含有するDNAを含有するDNAなどがあげられ、  
20 配列番号：3 3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAの具体例としては、配列番号：3 9で表される塩基配列を含有するDNAを含有するDNAなどがあげられ、配列番号：3 4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAの具体例としては、配  
25 列番号：4 0で表される塩基配列を含有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

また、本発明のペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAの中で例えば6個以上

51個以下(好ましくは9個以上30個以下、さらに好ましくは12個以上30個以下)の部分塩基配列を含有するDNA断片はDNA検出プローブとしても好ましく用いられる。

本発明のペプチドの前駆体をコードするDNAとしては、上記の本発明のペプチドの前駆体、具体的には、配列番号：29で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列(例えば、配列番号：30、配列番号：37または配列番号：38で表されるアミノ酸配列など)を含有するペプチド(ポリペプチド)などをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。

配列番号：29で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド(ポリペプチド)をコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAの具体例としては、配列番号：27で表される塩基配列を含有するDNAを含有するDNAなどがあげられ、配列番号：30で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAの具体例としては、配列番号：28で表される塩基配列を含有するDNAを含有するDNAなどがあげられ、配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAの具体例としては、配列番号：41で表される塩基配列を含有するDNAを含有するDNAなどがあげられ、配列番号：38で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNAの具体例としては、配列番号：42で表される塩基配列を含有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

本発明のペプチドなどをコードするDNAは、以下の遺伝子工学的手法によっても製造することができる。該遺伝子工学的手法は、例えば Molecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などがあげられる。また、市販のライブラリーやキットを使用する場合には、添付の使用説明書に記載の方法に従って行えればよい。

本発明のペプチドなどをコードするDNAは、そのペプチドのアミノ酸配列またはその一

部に基づきDNA断片を合成し標識したプローブを、ゲノムDNAまたはcDNAのライブラリー等とハイブリダイゼーションにすることによって選別することができる。

本発明のペプチドなどを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて、自体公知のPCR法に  
5 よってゲノムDNAまたはcDNAのライブラリー等から目的とするDNAを増幅するか、または適當なベクターに組み込んだDNAを例えば本発明のペプチドなどの一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。

クローン化された本発明のペプチドなどをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適當な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のペプチドなどの発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適當な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどが利用できる。宿主がエシェ

リヒア属菌である場合は、*t r p*プロモーター、*T 7*プロモーター、*lac*プロモーター、*r e c A*プロモーター、*λ P L*プロモーター、*I p p*プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、*S P O 1*プロモーター、*S P O 2*プロモーター、*p e n P*プロモーターなど、宿主が酵母である場合は、*PHO 5*プロモーター、*P G K*プロモーター、*G A P*プロモーター、*A D H 1*プロモーター、*G A L*プロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、*P 1 0*プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上その他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、*S V 4 0*複製オリジン（以下、*S V 4 0 o r i*と略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、*d h f r*と略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、*Amp<sup>R</sup>*と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、*N e o*と略称する場合がある、G 4 1 8 耐性）等があげられる。特に、*C H O* (*d h f r<sup>-</sup>*) 細胞を用いて*D H F R*遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ペプチドまたはその部分ペプチドのN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、*phoA*・シグナル配列、*O mp A*・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイテイングファクター $\alpha$  (*M F \alpha*)・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築されたペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫または昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) *K 1 2*・*D H 1*〔

プロセージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ  
・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM1  
03 [ヌクレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of  
5 Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・  
モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス  
(Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミスト  
10 リー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH  
22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。

昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature),  
315巻, 592(1985)]。

15 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞  
(*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG1細胞、  
*Trichoplusia ni* の卵由来のHigh Five TM 細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または  
*Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株  
化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、S  
20 f9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 [以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィトロ (in Vitro  
) , 13巻, 213-217頁 (1977年)] などが用いられる。

動物細胞としては、たとえばサルCOS-7細胞、Vero細胞、チャイニーズハムスター  
細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (CHO/dhfr<sup>-</sup>  
細胞)、マウスL細胞、マウス3T3細胞、マウスミエローマ細胞、ヒトHEK293細胞  
25 、ヒトFL細胞、293細胞、C127細胞、BALB3T3細胞、Sp-2/O細胞など  
が用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69巻, 2110(1972) やジーン (Gene) , 17巻, 107(1982) などに記載の方法に従って行なわれる。

5 バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111(1979) などに記載の方法に従って行なわれる。

酵母を形質転換するには、たとえばプロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 10 75巻, 1929(1978) に記載の方法に従って行なわれる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、たとえばバイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 6巻, 47-55頁(1988年) などに記載の方法に従って行なわれる。

動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456(1973) に記載の方法に従って行なわれる。

15 発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リポフェクション法 [Felgner, P. L. et al. プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) , 84巻, 7413頁(1987年)] 、リン酸カルシウム法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456-467頁(1973年)] 、電気穿孔法 [Nuemann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.) , 1巻, 841-845頁(1982年)] 等があげられる。

20 このようにして、本発明のペプチドなどをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

25 なお、動物細胞を用いて、本発明のペプチド等を安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選

5 择する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローニング選択を行なうことにより本発明のペプチド等の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。また、d h f r 遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、d h f r 遺伝子とともに、本発明のペプチドなどをコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

10 上記の形質転換体を本発明のペプチド等をコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明のペプチド等を生成、蓄積せしめることによって、本発明のペプチド等を製造することができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、15 コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM 20 9 培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジエネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

25 宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要に  
より通気や搅拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホールダー（  
Burkholder）最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・  
アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter,  
G. A ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイ  
ズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (19  
84) ] があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20  
℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や搅拌を加える。

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium  
(Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非働化した10%ウシ血清等の  
添加物を適宜えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが  
好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、必要に応じて通気や搅拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5～20%の  
胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], D  
MEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培  
地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the  
American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシージ  
ング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of  
the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。  
pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行い  
、必要に応じて通気や搅拌を加える。

特にCHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞およびdhfr 遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミ  
ジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むD MEM培地を用いるのが好ましい。  
上記培養物から本発明のペプチドなどを分離精製するには、例えば下記の方法により行な

うことができる。

本発明のペプチドなどを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりペ  
5 プチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100（登録商標。以下、TMと省略することがある。  
）などの界面活性剤が含まれていてもよい。

培養液中にペプチドが分泌される場合には、培養終了後、自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

10 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のペプチドなどの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、ア  
15 フィニティーコロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法やクロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のペプチドなどが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体  
20 公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。  
。

なお、形質転換体が産生する本発明のペプチドなどを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエ  
25 ンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のペプチドなどの存在は特異抗体を用いたエンザイムイムノアッ

セイなどにより測定することができる。

本発明のペプチドなどをコードするDNAまたは本発明のペプチドは、①ガラニン・レセプター蛋白質のリガンドの一部、あるいは全長の合成、②本発明のペプチドなどの有する生理作用の探索、③合成オリゴヌクレオチドプローブあるいはPCRのプライマーの作成、④G蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドや前駆体蛋白質をコードするDNAの入手、⑤組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑥抗体および抗血清の入手、⑦DNA、RNA、抗体または抗血清を用いた診断薬の開発、⑧記憶機能改善剤（向知能薬）、食欲調節剤、糖尿病治療薬、下垂体機能改善薬、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤、精巣機能調節剤または骨格筋機能調節剤（好ましくは、記憶機能改善剤（向知能薬）、食欲調節剤、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤、精巣機能調節剤または骨格筋機能調節剤）などの医薬の開発、⑨遺伝子治療等に用いることができる。

特に、後述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

さらに、上記⑧に関し、本発明のペプチドまたはそれをコードするDNAは、海馬、視床下部、子宮、腎臓、前立腺、骨格筋、脇臓、精巣、脾臓、心臓、下垂体などで発現しているガラニン・レセプター（GALR）蛋白質がリガンドとして認識するものであるので、安全で低毒性な医薬として有用であり、例えば、記憶機能改善剤（向知能薬）、食欲調節剤、糖尿病治療薬、下垂体機能改善薬、食欲調節剤、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤または骨格筋機能調節剤（好ましくは、記憶機能改善剤（向知能薬）、食欲調節剤、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤または骨格筋機能調節剤）などとして用いることができる。

本発明のペプチドまたはそれをコードするDNAを上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤

、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要  
5 求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

本発明のDNAを用いる場合は、該DNAを単独またはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。

10 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスター、トランガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスター、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合  
15 には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などの天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液  
20 (例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど) などがあげられ、適當な溶解補助剤、たとえばアルコール(たとえばエタノール)、ポリアルコール(たとえばプロピレンジリコール、ポリエチレンジリコール)、非イオン性界面活性剤(たとえばポリソルベート80(TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと  
25 併用してもよい。

また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、

塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

5 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物(例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、など)に対して投与することができる。

本発明のペプチドまたはそれをコードするDNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、該ペプチドを経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。該ペプチドを非経口的に投与する(例えば、静脈注射で投与する)場合は、その1回投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人(体重60kgとして)においては、一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは約0.1から1.0mg程度である。

15 他の動物の場合も、上記60kg当たりの投与量をその動物の体重に換算した量を投与することができる。

上記本発明において、ガラニン・レセプターとしては、ヒトや温血動物(例えば、哺乳温血動物(例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ)、鳥類(例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ)など)のあらゆる組織(例えば、下垂体、膵臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など)または細胞などに由来するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であって、GALR1としては配列番号:1、GALR2としては配列番号:2、GALR3としては配列番号:3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。即ち、該レセプター蛋白質としては、配列番号:1、2または3で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質などの他に、配列

番号：1、2または3で表わされるアミノ酸配列と約90～99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号：1、2または3で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などがあげられる。

これらの蛋白質が示す活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナル伝達活性などがあげられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。従って、リガンド結合活性やシグナル伝達活性の強さなどの強弱、レセプター蛋白質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

さらに、該レセプター蛋白質には、N末端のMetが保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイル基など）で保護されているもの、N末端のグルタミン残基が10 ピログルタミン酸化したものの分子内のアミノ酸の側鎖が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

該レセプター蛋白質の塩としては、上記したペプチドの塩と同様のものがあげられる。

該レセプター蛋白質またはその塩またはその部分ペプチドは、ヒトや温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、前述のペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養する方法と同じ方法によっても製造することができる。また、前述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

該レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。すなわちG蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

該レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩としては、上記したペプチドの塩と同様のものが25 用いられる。

該ガラニン・レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：1、2または3

のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するガラニン・レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、それらは、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、組織・細胞由来のcDNA、組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりRNA画分を調製したものを用いて直接自体公知のRT-PCR法によって増幅することもできる。

配列番号：1、2および3のアミノ酸配列を含有するガラニン・レセプターをコードするDNAとして具体的には、それぞれ配列番号：4、5および6で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

GALR 2（ガラニン・レセプター・タイプ2）は海馬、視床下部、子宮、腎臓、前立腺、骨格筋などに多く分布しており、従って、GALR 2活性化能を有するアゴニストである本発明のペプチド（あるいはGALR 2に対するアンタゴニスト、及び本発明のペプチドに対する中和抗体）は記憶機能改善剤、食欲改善剤、または子宮、腎臓、前立腺もしくは骨格筋の機能改善剤として用いることができる。

GALR 1（ガラニン・レセプター・タイプ1）は、視床下部、海馬、脾臓などに多く分布しており、従って、GALR 1活性化能を有するアゴニストである本発明のペプチド（あるいはGALR 1に対するアンタゴニスト、及び本発明のペプチドに対する中和抗体）は、抗肥満薬、向知能薬、インスリン分泌薬として用いることができる。

GALR 3（ガラニン・レセプター・タイプ3）は、精巣、脾臓、心臓、視床下部、下垂体などに分布しており、従って、GALR 3活性化能を有するアゴニストである本発明のペプチド（あるいはGALR 3に対するアンタゴニスト、及び本発明のペプチドに対する中和抗体）は、精巣、脾臓、心臓の機能改善剤として用いることができる。

本発明は、（1）上記のガラニン・レセプターをコードするDNAを含有する形質転換体（細胞）を培養して得られる該ガラニン・レセプターを発現している細胞膜画分に、①被検物質を接触させる場合と、②被検物質を接触させない場合における、例えば<sup>35</sup>S標識グ

アノシン-5'-0-3-チオ三りん酸の該細胞膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするガラニンレセプター活性化物質（アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、および（2）上記のガラニン・レセプターをコードするDNAを含有する形質転換体（細胞）を培養して得られる該ガラニン・レセプターを発現している細胞膜画分に、① ガラニンまたは本発明ペプチドを接触させる場合と、② ガラニンまたは本発明ペプチドを被検物質存在下で接触させる場合における、例えば  $^{35}$ S 標識グアノシン-5'-0-3-チオ三りん酸の該細胞膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするガラニンレセプター活性化阻害物質（アンタゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法などを提供する。

本発明のスクリーニング方法を以下に具体的に説明する。

上記ガラニン・レセプター蛋白質としては、GALR1、GALR2またはGALR3のいずれのガラニン・レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを含有し、そのレセプター機能を有するものであれば何れのものであってもよいが、形質転換体（細胞）を用いて該ガラニン・レセプター蛋白質を大量発現している培養細胞より調製した細胞膜画分（その調製法は後述する）などが好ましい。

該ガラニン・レセプター蛋白質を含有する細胞としては、ガラニン・レセプター蛋白質を発現する宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、例えば、前述の酵母、昆虫細胞、動物細胞などがあげられるが、動物細胞が好ましい。

該膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica 社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm ~ 3000 rpm）で短時間（通常、約1分~10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm~30000 rpm）で通常30分~2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分は主として膜蛋白質と細胞膜を構成するりん脂質から成り、発現したガラニン

・レセプターと同時に該細胞が本来発現しているG蛋白も含まれている。

該ガラニン・レセプターを含有する細胞や膜画分中のガラニンレセプターの量は、膜画分蛋白質 1 mg 当たり 1-100 pmol であるのが好ましく、5-20 pmol であるのがより好適である。該ガラニン・レセプターの発現量が多いほど膜画分当たりのレセプターを活性化する活性(リガンド結合活性、比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

ガラニン・レセプターを活性化する化合物(アゴニスト) のスクリーニング方法として具体的には、まずガラニン・レセプターを含有する細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより該レセプター標品を調製する。該バッファーとしては、pH 約 4 ~ 約 10 (望ましくは pH 約 6 ~ 約 8) の約 1 ~ 5 mM のマグネシウムイオンを含むリン酸バッファーまたはトリス-塩酸バッファーなどのいずれでも良く、さらにグアノシン二りん酸(GDP) を約 0.1 nM ~ 100 μM、好ましくは約 0.1 ~ 1 μM 添加するとよい。また、プロテアーゼによる該レセプターや被検物質の分解を抑える目的で、PMSF、ロイペプチド、E-64 (ペプチド研究所製) 、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加してもよい。約 0.01 ~ 10 mI の該レセプター溶液に、一定量(5000 cpm ~ 50000 cpm) の<sup>35</sup>S 標識グアノシン-5'-0-3-チオ三りん酸、および被検物質を添加する。一方、被検化合物を加えず、<sup>35</sup>S 標識グアノシン-5'-0-3-チオ三りん酸のみを添加した反応系(対象群) も用意する。反応は約 0 ~ 50°C、好ましくは約 4°C ~ 37°C で約 20 分 ~ 24 時間、好ましくは約 30 分 ~ 3 時間行う。反応後、ガラス纖維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維濾紙に残存する<sup>35</sup>S 標識グアノシン-5'-0-3-チオ三りん酸の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。被検化合物を加えない場合の放射活性に比べて被検化合物をえた場合の放射活性の増加分の高い化合物であれば、それを該ガラニン・レセプターを活性化する能力のある候補化合物として選択することができる。

該ガラニン・レセプターの活性化を阻害する化合物(アンタゴニスト) のスクリーニングを行うには、上記アゴニストのスクリーニングの場合と同様に細胞膜画分を用意し、これに

一定量(5000 cpm~50000 cpm)の<sup>35</sup>S標識グアノシン-5'-0-3-チオ三りん酸、および10-4~10-6Mのガラニンあるいは本発明によるペプチド、および被検物質を添加する。また、<sup>35</sup>S標識グアノシン-5'-0-3-チオ三りん酸とガラニンあるいは本発明によるペプチドを添加し被検化合物を加えない反応系(対象群)も用意する。上記と同様に反応を行い、被検化合物を加えない場合の放射活性に比べて被検化合物を加えた場合の放射活性の減少の大きい化合物であれば、それを該ガラニン・レセプターの活性化を阻害する能力のある候補化合物として選択することができる。

該被検物質としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

ガラニン・レセプター・アゴニストは、ガラニン・レセプターに対する本発明のペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、本発明のペプチドと同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、ガラニン・レセプター・アンタゴニストは、ガラニン・レセプター蛋白質に対する本発明のペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

上記のスクリーニング方法を用いて得られる物質の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-二ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシリルアミン、ジシクロヘキシリルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩あげられる。

無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩があげられる。  
5

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニンなどの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などの塩があげられる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質またはその塩を上述の医薬として使用する場合、上記の本発明のペプチドを医薬として実施する場合と同様にして実施することができる。  
10

本発明のペプチドに対する抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

15 例えば、ポリクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

#### [ポリクローナル抗体の作製]

本発明のペプチドに対するポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（ペプチド等抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、後述のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物（例えば、哺乳温血動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。  
20

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテン（本発明のペプチドまたはその部分ペプチド）との混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くで  
25

きれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等のキャリアー・タンパク質を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカップリングさせる方法が用いられる。

5 また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、上記温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュ10 バントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取される。

抗血清中の本発明のペプチドに対する抗体価の測定は、後述のハイブリドーマ培養上清の15 抗体価の測定と同様にして測定できる。抗体の分離精製は、後述のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

また、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

#### [モノクローナル抗体の作製]

##### (a) モノクロナール抗体産生細胞の作製

20 本発明のペプチドは、温血動物（例えば、哺乳温血動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジユバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回25 ずつ、計2～10回程度行われる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された上記の温血動物、たと

えればマウスなどから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識剤で標識化されたペプチドまたはその部分ペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、たとえばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー(Nature)、256、495(1975)〕等に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウイルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髄腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG6000)が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

本発明のペプチドに対する抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、たとえば本発明のペプチド抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合した本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明のペプチドを加え、固相に結合した本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT(ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好まし

くは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。  
5 培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の本発明のペプチドに対する抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクロナール抗体の精製

本発明のペプチドに対するモノクロナール抗体の分離精製は通常のポリクロナール抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行われる。

上記の（a）および（b）の方法に従って製造させる本発明のペプチドに対する抗体は、それぞれ本発明のペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

(i) 本発明のペプチドに反応する抗体と、被検液および標識した本発明のペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識した本発明のペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法、

20 (ii) 被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法において、一方の抗体が、本発明のペプチドのN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のペプチドのN端部以外の部位（例えば、C端部）に反応する抗体であることを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法を提供する。

25 本発明のペプチドを認識するモノクロナール抗体を用いて本発明のペプチドの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子その

ものを用いてもよく、また、抗体分子の  $F(ab')_2$  、  $Fab'$  、あるいは  $Fab$  画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えばリガンドペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などがあげられる。放射性同位元素としては、例えば  $[^{125}I]$  、  $[^{131}I]$  、  $[^3H]$  、  $[^{14}C]$  などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば  $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれあげられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のペプチドに対する抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化された本発明のペプチドに対する抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なつてもよいし時間をずらして行なってもよい。

標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも

1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のペプチドの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のペプチドに対する抗体は本発明のペプチドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のペプチドのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC末端部以外、例えばN末端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のペプチドに対する抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体などを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のペプチドまたはその部分ペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる

[例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年5月発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）など参照]。

以上のように、本発明のペプチドに対する抗体を用いることによって、本発明のペプチドを感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のペプチド等の濃度を定量することによって、診断薬として用いることもできる。即ち、

15 (1) 本発明のタンパク質等の濃度の変化が検出された場合、例えば、肥満症、痴呆、糖尿病、または下垂体腫瘍などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと、と診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質等を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質等の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

20 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

c	DNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A		: アデニン
T		: チミン
G		: グアニン
5	C	: シトシン
	Y	: チミンまたはシトシン
	N	: チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン
	R	: アデニンまたはグアニン
	M	: シトシンまたはアデニン
10	W	: チミンまたはアデニン
	S	: シトシンまたはグアニン
	I	: イノシン
	H	: アデニン、チミンまたはシトシン
	D	: グアニン、アデニンまたはチミン
15	B	: グアニン、チミンまたはシトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャー リボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
20	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
25	EIA	: エンザイムイムノアッセイ
	Gly または G	: グリシン

	A l a または A	: アラニン
	V a l または V	: バリン
	L e u または L	: ロイシン
	I l e または I	: イソロイシン
5	S e r または S	: セリン
	T h r または T	: スレオニン
	C y s または C	: システイン
	M e t または M	: メチオニン
	G l u または E	: グルタミン酸
10	A s p または D	: アスパラギン酸
	L y s または K	: リジン
	A r g または R	: アルギニン
	H i s または H	: ヒスチジン
	P h e または F	: フェニルアラニン
15	T y r または Y	: チロシン
	T r p または W	: トリプトファン
	P r o または P	: プロリン
	A s n または N	: アスパラギン
	G l n または Q	: グルタミン
20	p G l u	: ピログルタミン酸
	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
25	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

T o s : p - トルエンスルフォニル

H O N B : N - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネ - 2 , 3 - ジカルボキシミド

B z 1 : ベンジル

C l<sub>2</sub> - B z 1 : ジクロルベンジル

5 Z : ベンジルオキシカルボニル

B r - Z : 2 - ブロモベンジルオキシカルボニル

C l - Z : 2 - クロルベンジルオキシカルボニル

B o c : t - プチルオキシカルボニル

H O B t : 1 - ヒドロキシベンズトリアゾール

10 D C C : N , N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド

T F A : トリフルオロ酢酸

F m o c : N - 9 - フルオレニルメトキシカルボニル

D N P : ジニトロフェニル

B u m : ターシャリーブトキシメチル

15 T r t : トリチル

P A M : フェニルアセトアミドメチル

B H A : ベンツヒドリルアミン

B o m : ベンジルオキシメチル

O c H e x : シクロヘキシルエステル

20 M e B z 1 : 4 - メチルベンジル

CHO : ホルミル

N M P : N - メチルピロリドン

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

25 ラット型のGAL R 1 (ガラニン・レセプター・タイプ1) の全アミノ酸配列を示す。  
[配列番号：2]

ラット型のGAL R 2 (ガラニン・レセプター・タイプ2) の全アミノ酸配列を示す。

[配列番号：3]

ラット型のGAL R 3 (ガラニン・レセプター・タイプ3) の全アミノ酸配列を示す。

[配列番号：4]

5 ラット型のGAL R 1 (ガラニン・レセプター・タイプ1) のc DNAの塩基配列を示す

。

[配列番号：5]

ラット型のGAL R 2 (ガラニン・レセプター・タイプ2) のc DNAの塩基配列を示す

。

10 [配列番号：6]

ラット型のGAL R 3 (ガラニン・レセプター・タイプ3) のc DNAの塩基配列を示す

。

[配列番号：7]

ブタ型のガラニンの全アミノ酸配列（29残基）を示す。

15 [配列番号：8]

ブタ型のガラニン前駆体 preprogalanin (1-123) のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：9]

ブタ型のガラニン前駆体 preprogalanin (24-61) のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：10]

20 ブタ型のガラニン前駆体 preprogalanin (37-61) のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：11]

ブタ型の本発明ペプチドの部分アミノ酸配列（N末端から34残基）を示す。

[配列番号：12]

ブタ型の本発明ペプチドの部分アミノ酸配列（N末端から32残基）を示す。

25 [配列番号：13]

ブタ型の本発明ペプチドのキモトリプシン消化断片（CHY-1）の部分アミノ酸配列（

N末端から9残基)を示す。

[配列番号: 14]

ブタ型の本発明ペプチドのキモトリプシン消化断片(CHY-4)の部分アミノ酸配列(6残基)を示す。

5 [配列番号: 15]

ブタ型の本発明ペプチドのキモトリプシン消化断片(CHY-3)の部分アミノ酸配列(27残基)を示す。

[配列番号: 16]

10 ブタ型の本発明ペプチドのキモトリプシン消化断片(CHY-2)の部分アミノ酸配列(11残基)を示す。

[配列番号: 17]

ブタ型の本発明ペプチドの部分アミノ酸配列(44残基)を示す。

[配列番号: 18]

15 ラット型のGALR2をコードするcDNAの塩基配列のスクリーニングに使用した合成DNA(プライマー1)を示す。

[配列番号: 19]

ラット型のGALR2をコードするcDNAの塩基配列のスクリーニングに使用した合成DNA(プライマー2)を示す。

[配列番号: 20]

20 デジエネレートPCR(Degenerated PCR)法で使用した合成DNA(プライマー pGAL4-7F)を示す。

[配列番号: 21]

デジエネレートPCR(Degenerated PCR)法で使用した合成DNA(プライマー pGAL9-3F)を示す。

25 [配列番号: 22]

デジエネレートPCR(Degenerated PCR)法で使用した合成DNA(プライマー pGAL34-1R)

) を示す。

[配列番号： 2 3]

pCR100-6 中の nested PCR 産物の塩基配列を示す。

[配列番号： 2 4]

5 pCR100-7 中の nested PCR 産物の塩基配列を示す。

[配列番号： 2 5]

ハイブリダイゼーションプローブ作製に使用した合成DNA（プライマー pGAL9-3F）を示す。

[配列番号： 2 6]

10 ハイブリダイゼーションプローブ作製に使用した合成DNA（プライマー pGAL34-8R）を示す。

[配列番号： 2 7]

実施例5で得られたp GR 2 PL 6 中のc DNAの塩基配列を示す。

[配列番号： 2 8]

15 実施例5で得られた p GR 2 PL 3 中のc DNAの塩基配列を示す。

[配列番号： 2 9]

p GR 2 PL 6 中のc DNAの塩基配列から推定される本発明ペプチドの前駆体の配列を示す。

[配列番号： 3 0]

20 p GR 2 PL 3 中のc DNAの塩基配列から推定される本発明ペプチドの前駆体の配列を示す。

[配列番号： 3 1]

p GR 2 PL 6 およびp GR 2 PL 3 中のc DNAの塩基配列から推定される本発明ペプチドの成熟蛋白質（ブタ型）の配列を示す。

25 [配列番号： 3 2]

本発明ペプチドの成熟蛋白質をコードするc DNA配列（ブタ型）を示す。

[配列番号：33]

本発明ペプチドの成熟蛋白質（ラット型）の配列を示す。

[配列番号：34]

本発明ペプチドの成熟蛋白質（ヒト型）の配列を示す。

5 [配列番号：35]

本発明ペプチドの成熟蛋白質（ラット型・ヒト型共通）の部分アミノ酸配列（N末端から9残基）を示す。

[配列番号：36]

10 本発明ペプチドの成熟蛋白質（ラット型・ヒト型共通）の部分アミノ酸配列（N末端から21残基）を示す。

[配列番号：37]

本発明ペプチドの成熟蛋白質（ラット型）の前駆体タンパク質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：38]

15 本発明ペプチドの成熟蛋白質（ヒト型）の前駆体タンパク質のアミノ酸配列を示す。

15 [配列番号：39]

本発明ペプチドの成熟蛋白質（ラット型）をコードするcDNA配列を示す。

[配列番号：40]

本発明ペプチドの成熟蛋白質（ヒト型）をコードするcDNA配列を示す。

[配列番号：41]

20 本発明ペプチドの成熟蛋白質（ラット型）の前駆体タンパク質をコードするcDNA配列を示す。

[配列番号：42]

本発明ペプチドの成熟蛋白質（ヒト型）の前駆体タンパク質をコードするcDNA配列を示す。

25 [配列番号：43]

本発明ペプチドの成熟蛋白質（ブタ型）の部分アミノ酸配列（N末端から30残基）を示す。

す。

〔配列番号：44〕

実施例9で用いられた免疫原としてのペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：45〕

5 実施例18で用いられたプラスミドpGR2PL6のEcoRI/BglII消化断片のDNA配列を示す

〔配列番号：46〕

実施例18で用いられたプライマーpGAL1-1FのDNA配列を示す。

〔配列番号：47〕

10 実施例18で用いられたプライマーpGAL88-1RのDNA配列を示す。

〔配列番号：48〕

実施例19で用いられたプライマーF/R120のDNA配列を示す。

〔配列番号：49〕

実施例19で用いられたプライマーR/R120のDNA配列を示す。

15 〔配列番号：50〕

実施例19のPCRの結果得られたのcDNA配列を示す。

〔配列番号：51〕

実施例19で用いられたプライマー1F/H120のDNA配列を示す。

〔配列番号：52〕

20 実施例19で用いられたプライマー1R/H120のDNA配列を示す。

〔配列番号：53〕

実施例19で用いられたプライマー1F/H470のDNA配列を示す。

〔配列番号：54〕

実施例19で用いられたプライマー1R/H470のDNA配列を示す。

25 〔配列番号：55〕

実施例20で用いられたプライマー1のDNA配列を示す。

[配列番号：56]

実施例20で用いられたプライマー2のcDNA配列を示す。

[配列番号：57]

実施例20で用いられたプライマー3のDNA配列を示す。

5 [配列番号：58]

実施例20で用いられたプライマー4のDNA配列を示す。

[配列番号：59]

実施例21で用いられた合成DNA配列を示す。

[配列番号：60]

10 実施例21で用いられた合成DNA配列を示す。

[配列番号：61]

ラットガラニンのアミノ酸配列を示す（ラットガラニンは配列番号：61のC末端がアミド化されたものである）。

後述の実施例5で得られた形質転換体 *Escherichia coli* TOP10/p GR2PL6 は、財団法人  
15 発酵研究所（IFO）に1998年8月21日から寄託番号 IF0 16201 として、また、日本国  
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH、日本国茨城県つくば市東1丁目  
1番3号）に1998年9月4日から寄託番号 FERM BP-6486 として寄託されている。

後述の実施例19で得られた形質転換体 *Escherichia coli* TOP10/p GR2HL14 は、財団法  
人発酵研究所（IFO）に1999年2月5日から寄託番号 IF016256 として、また、日本国通  
20 商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH、日本国茨城県つくば市東1丁目1  
番3号）に1999年2月22日から寄託番号 FERM BP-6657 として寄託されている。

後述の実施例18で得られた形質転換体 *Escherichia coli* TOP10/p GR2RL4 は、財団法  
人発酵研究所（IFO）に1999年2月5日から寄託番号 IF016257 として、また、日本国通  
商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH、日本国茨城県つくば市東1丁目1  
25 番3号）に1999年2月22日から寄託番号 FERM BP-6658 として寄託されている。

後述の実施例21で得られた形質転換体 *Escherichia coli* MM294(DE3)/pTFCGAL は、財団

法人発酵研究所（I F O）に 1999 年 2 月 26 日から寄託番号 IF016260 として、また、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（N I B H, 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に 1999 年 3 月 10 日から寄託番号 FERM BP-6678 として寄託されている。

後述の実施例 2-1 で用いられた形質転換体 *Escherichia coli* MM294 (DE3) / pT<sub>B960-11</sub> は、財団法人発酵研究所（I F O）に 1997 年 6 月 25 日から寄託番号 IF016100 として、また、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（N I B H, 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に 1998 年 6 月 15 日から寄託番号 FERM BP-6388 として寄託されている。

後述の実施例 2-1 で用いられた形質転換体 *Escherichia coli* MM294 (DE3) / pT<sub>C11d23-MP1F1</sub> は、財団法人発酵研究所（I F O）に 1998 年 10 月 27 日から寄託番号 IF016212 として、また、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（N I B H, 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に 1998 年 11 月 23 日から寄託番号 FERM BP-6582 として寄託されている。

後述の実施例 1-3 で用いられた GR2-1 N は、財団法人発酵研究所（I F O）に 1999 年 3 月 11 日から寄託番号 IF0 50515 として、また、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（N I B H, 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に 1999 年 3 月 17 日から寄託番号 FERM BP-6682 として寄託されている。

以下に、実施例を示し、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1 ガラニン・レセプター (GALR1, GALR2) 活性化作用の検出

(1-1) ラット型ガラニン・レセプター (GALR1, GALR2) 発現細胞の構築

ラット GALR2 遺伝子を得るために、ラット視床下部 cDNA (CLONTECH 社) を 2 μl, 10 μM の

プライマー 1 (5'-GTCGACATGAATGGCTCCGGCAGCCAG-3'、配列番号：18) および

プライマー 2 (5'-ACTAGTTAACAGCCGGATCCAGGGTTCTAC-3'、配列番号：19)

を各 1 μl, 10 倍濃縮緩衝液 (CLONTECH 社製 Klen Taq Polymerase に添付のもの) を 5 μl

、10mM のデオキシヌクレオチドミクスチャー (Invitrogen 社) を 1  $\mu$  l、Klen Taq DNA polymerase (CLONTECH 社) を 1  $\mu$  l、注射用蒸留水 (大塚製薬) を 39  $\mu$  l を混合し、PCR 反応溶液を調製した。PCR 反応は、Gene Amp PCR System 9700 (PERKIN ELMER 社) を用いて、① (95°C、5 分) を 1 サイクル、② (95°C、30 秒； 76°C、15 秒； 72°C、2 分) を 3 サイクル、③ (95°C、30 秒； 72°C、15 秒； 72°C、2 分) を 3 サイクル、④ (95°C、30 秒； 68°C、15 秒； 72°C、2 分) を 3 サイクル、⑤ (95°C、30 秒； 64°C、15 秒； 72°C、2 分) を 3 サイクル、⑥ (95°C、30 秒； 60°C、15 秒； 72°C、2 分) を 3 サイクル、⑦ (95°C、30 秒； 56°C、15 秒； 72°C、2 分) を 20 サイクルと設定して反応を行なった。該 PCR 反応後の溶液 10  $\mu$  l を、1 % 低融点アガロースゲル (Sea Plaque GTG : FTN 社) 上で電気泳動を行い、PCR 反応産物をエチジウムプロマイド染色により確認した。該 PCR 反応産物として得られた約 1.2 kbp 付近のDNA バンドを公知の方法により、アガロースゲルから回収した。即ち、アガロースゲル断片を 0.5 ml のサンプリングチューブに移し 70°C に加温し融解後、40°C に平衡化した後、アガロースを分解させるためにベータアガラーゼ (ニッポンジーン社) を 0.5  $\mu$  l 加え 60 分間反応させた。該反応液から公知のエタノール沈殿法により目的のDNA 断片を回収し、PCR-SCRIPT (STRATAGENE 社) プラスミド・ベクターとライゲーション反応を行なった。該反応液を Competent High (JM109 : TOYOBO 社) に加え、形質転換を行ない、100  $\mu$  g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地 (和光純薬社) で一晩培養した。該培地上のコロニーをコロニー-PCR 法にて目的DNA 断片の挿入の有無を確認した。挿入DNA 断片を有するコロニーを 100  $\mu$  g/ml のアンピシリンを含む LB 培地 (和光純薬社) で一晩培養し、その培養液から Plasmid Mini Kit (Q I A G E N 社) を用いて挿入DNA 断片を有するプラスミドを回収した。塩基配列解析のための反応は、Dye primer cycle sequencing ready reaction (ABI 社) を用いて行い、蛍光式自動シークエンサーによる塩基配列解析により、該プラスミド中の挿入DNA 断片が 1119 bp からなる GALR2 をコードするDNA であることを確認した。

特開平 7-304797 号公報の実施例 4 に記載の方法により、動物細胞用発現ベクター pAKKO-1.11 を作製した。公知の方法により、該プラスミドから GALR2 をコードする DNA 断

片を回収し、ベクター pAKK0-1.11 に連結し、大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入して形質転換体を得た。この形質転換体を培養して GALR2 をコードする DNA を含むプラスミドを調製した。

該プラスミドを CellPfect Transfection kit (ファルマシア社) を用いて次の手順で CHO 細胞へ形質導入し、目的の GALR2 発現細胞を得た。まず、蒸留水 240  $\mu$  l に溶解したプラス  
5 ミド DNA 9.6 mg に対して Buffer A (CellPfect Transfection Kit に添付) 240  $\mu$  l を添加し、攪拌し、10 分間静置後、Buffer B (CellPfect Transfection Kit に添付) 480  $\mu$  l を添加し、激しく攪拌し該 DNA を含有するリポソームを形成させた。 $4 \times 10^5$  個の CHO/dhfr - 細胞 (ATCC より入手) を 60 mm シャーレに播き、10% のウシ胎児血清 (BIO WHITTAKER 社)  
10 ) を含む Ham's F-12 培地 (日水製薬株式会社) 中で 37°C、5% 炭酸ガス中で 2 日間培養した後、該リポソーム 480  $\mu$  l をシャーレの該細胞上に滴下させた。これを、37°C、5% 炭酸ガス中にて 6 時間培養した後、血清を含まない Ham's F-12 培地で 2 回細胞を洗浄し、シャーレの該細胞上に 15% グリセロール 3 ml を添加し 2 分間処理した。これを、再度、血清を含まない Ham's F-12 培地で 2 回洗浄した後、10% のウシ胎児血清を含む Ham's F-12 培地  
15 中で 37°C、5% 炭酸ガス中で 15 時間培養した。該細胞をトリプシン処理により分散させてシャーレから回収し、 $1.25 \times 10^4$  個ずつ 6-well plate に播き、透析済み 10% ウシ胎児血清 (JRH BIOSCIENCES 社) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地 (日水製薬株式会社) 中にて 37°C、5% 炭酸ガス中にて培養を開始した。プラスミドの導入された形質転換 CHO 細胞は該培地中で生育するが非導入細胞は次第に死滅していくので、培養開始  
20 1 日目、および 2 日目に培地を交換して死滅細胞を除去した。培養開始 8 日後に生育してきた形質転換 CHO 細胞のコロニーを 20 個 (20 種の CHO 細胞クローン) 選んだ。それぞれ選択された細胞 (20 種の CHO 細胞クローン) を回収し、後述の実施例 (1-2) に記載の方法で  
膜画分を調製した。膜画分に対する ブタ  $^{125}$ I-galanin (New England Nuclear 社) の結合量を公知の方法 (例えば、EP-0711830A の実施例に記載の方法) により測定し、GALR2  
の発現量の高い細胞株を選別し、以降の実験に用いた。  
25 GAL R 1 をコードする cDNA は、上記 GAL R 2 をコードする cDNA の取得法と同様にして取得した。プライマー 3 および 4 ラットを用い、脳 cDNA ライブラリー (CLONTECH

社) から、PCR 反応により 1486bp からなるラット GALR1 cDNA を取得し、pUC119 (TAKARA SHUZO 株式会社) に挿入し、プラスミド pRGR2 と命名した。

このプラスミドを制限酵素 EcoRI および Pst I で二重消化して得られた cDNA 断片を、動物細胞用発現プラスミドベクター pcDNA I (Invitrogen 社) を制限酵素 EcoRI および NsiI 5 で二重消化した部分に組み込み、プラスミド pRGRPC と命名した。このプラスミド pRGRPC を制限酵素 Hind III および Xba I で二重消化して得られた cDNA 断片を動物細胞用発現プラスミドベクター pRc/CMV (Invitrogen 社) の Hind III および Xba I で二重消化したベクターに組み込み、ラット GALR1 cDNA 発現プラスミド pRGR 1 を得た。

CellPfect Transfection Kit (Pharmacia 社) を使用する公知のリン酸カルシウム法により、Ham's F12 培地 (日本製薬株式会社) で培養した CHO-K1 細胞 (ATCC より入手) にラット GALR1 cDNA 発現プラスミド pRGR 1 を導入し、最終的に 500 μg/ml G-418 耐性の 24 クローンをステンレスシリンダーを用いて単離した。このようにして単離した 24 クローンの一部の細胞を 6 ウエルプレートにまき、飽和状態にまで培養した後、100 pM ブタ・<sup>1</sup> 2<sup>5</sup>I-ガラニン (New England Nuclear 社) に対する結合実験 (例えば、EP-0711830A の実施例に記載の方法) を行い、24 クローンにおけるラットガラニン受容体の発現量を調べた。その結果、No. 3 の細胞がブタ・<sup>1</sup>2<sup>5</sup>I-ガラニンとの結合活性が最も高く、GALR1 の発現量が最も多いと考えられた。そこで、限界希釈法により No. 3 の細胞を 96 ウエルマイクロプレート中 2 ウエルに 1 個の割合でまき、1 個の細胞から増殖させた。单一にした細胞から 12 個のクローン細胞を単離し、その一部の細胞を用いて再度同様の結合実験を行った。20 その結果、No. 3-10 のクローン細胞が <sup>1</sup>2<sup>5</sup>I-ブタガラニンとの結合活性が最も高く、GALR1 の発現量が最も多いと考えられたので、以後、このクローンを GALR1 発現細胞として使用した。

#### (1-2) ガラニン・レセプター (GALR1, GALR2) 発現細胞膜画分の調製

上記 (1-1) で得た GALR2 発現細胞を、10% ウシ胎児血清、グルタミン、ペニシリン、ス 25 トレプトマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地中でサブ・コンフルエント (80~90% コンフルエント) になるまで培養した。培養後の細胞を、2.7 mM エチレンジアミン-

N, N, N', N' -四酢酸(EDTA)を含むリン酸緩衝液 [2.7 mM EDTA / Phosphate-buffer saline (138mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)] を加え懸濁することにより培養器から遊離させ、遠心操作により該細胞を回収した。該細胞をプロテアーゼ・インヒビター・ミクスチュア（終濃度はそれぞれ、0.5 mM フェニルメチルサルフォニルフルオラ  
5 イド、20 μg/ml ロイペプチド、4 μg/ml E-64、10 μg/ml ペプスタチン）を含む 10 mM 炭酸水素ナトリウム、5 mM EDTA (pH 7.3) 緩衝液中で、ポリトロン・ホモジエナイザーを用いてホモジエナイズした。ホモジエネートを、高速遠心機 (CR26H、RR24A 型ローター：日立  
株式会社) を用いて 2500 rpm、10 分間遠心し、得られた上清を、超遠心機 (SCP70H、RP42  
型ローター：日立株式会社) を用いて 30,000 rpm、1 時間遠心して沈殿を得た。この沈殿を  
10 再度プロテアーゼ・インヒビター・ミクスチュア (0.5 mM フェニルメチルサルフォニルフルオライド、20 μg/ml ロイペプチド、4 μg/ml E-64、10 μg/ml ペプスタチン) を含む  
10 mM 炭酸水素ナトリウム、5 mM EDTA (pH 7.3) 緩衝液に懸濁し、ガラニン・レセプター活性化作用の検出用の膜画分とした (-70°C に保存)。

(1-3) [<sup>35</sup>S]GTPγS結合試験によるガラニン・レセプター活性化作用の検出  
15 上記 (1-2) で調製した膜画分を、濃度が 40 μg/ml (GALR1 膜画分の場合) または 32 μg/ml (GALR2 膜画分の場合) になるように、1 μM グアノシン-5'-二りん酸(GDP)、0.1% ウシ血清アルブミン(BSA)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、150 mM NaCl を含む 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、各 0.2 ml ごとポリプロピレン製小試験管(Falcon 2053) に分注した。分注した膜画分に 50 nM [<sup>35</sup>S]GTPγS (New England Nuclear) を 2 μl、およびアゴニストとしてブタ・ガラニン (100 μM, 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM、または 10 pM の各濃度で) 2 μl を添加し、25°C で 60 分間反応した。該反応液に、1.5 ml の 0.05% 3-[3-コールアミドプロピル]ジメチルンモニオ]プロパンスルфон酸(CHAPS)、0.1% BSA、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA を含む 50 mM トリス緩衝液(pH 7.4) を加え、GF/F ガラス織維ろ紙 (ワットマン社) でろ過した。このろ紙を、1.5 ml の同緩衝液で洗浄し乾燥させた後  
20 、液体シンチレーション・カウンターにより放射活性を計測した。

その結果、ガラニン濃度依存的に [<sup>35</sup>S]GTPγS 結合量の増加がみとめられ (図 1)

、本法によりガラニンレセプターのアゴニスト活性を測定できることが明らかになった。

ラット・ガラニンの EC<sub>50</sub> 値（最大結合量の半分の結合量を与える濃度）は、GALR1 の場合で約 3 nM、また GALR2 の場合で約 10 nM であった。

5 実施例 2 GALR2 (ガラニン・レセプター・タイプ2) を活性化する化合物のスクリーニング

(2-1) ブタ視床下部抽出液の調製

ブタ視床下部を東京芝浦臓器（株）で購入し、3 時間以内に以下の操作を行い抽出液を調製した。

10 先ず、ブタ視床下部 35 個（約 500 g）を包丁を用いて細かく切り刻み、沸騰した 1250 ml の蒸留水を含む 3000 ml ピーカーに入れ、10 分間煮沸した。煮沸後の視床下部をピーカーごと水浴、次いで氷浴して、温度を約 4°Cまで下げた。該視床下部を煮沸に用いた蒸留水とともに、ポリトロン・ホモジエナイザーを用いて 10 分間ホモジエナイズした。得られたホモジネートに終濃度が 1 M になるように酢酸 90 ml を滴下し、1 時間攪拌した。ホモジネートを、高速遠心機 (CR26H、RR10A 型ローター：日立株式会社) を用いて、10,000 rpm  
15 、30 分間遠心し上清（1）を得た。一方、遠心後に得られた沈殿を、再度 1 M 酢酸 2000 ml を加えてポリトロン・ホモジエナイザーを用いて 10 分間ホモジエナイズした。このホモジネートを、攪拌翼を用い一晩（約 16 時間）攪拌した後、ポリトロン・ホモジエナイザーを用いて 10 分間ホモジエナイズし上清（2）を得た。上清（1）と上清（2）を混合し、  
20 その 2 倍容量のアセトンを加え、4°Cにて 1 時間攪拌し、次いで高速遠心機 (CR26H、RR10A 型ローター：日立株式会社) を用いて 10,000 rpm、15 分間遠心し上清を得た。得られた上清をロータリー・エバポレーターにかけ、アセトンを除去し、最終的に 4000 ml まで濃縮した。この濃縮液を、超遠心機 (SCP70H、日立 RPZ35T 型ローター：日立株式会社) を用いて  
25 、35,000 rpm、1 時間遠心し、清澄な上清を得た。得られた上清を、1000 ml ごとに 500 ml のジエチルエーテルと混合し、分液ロート中にて激しく混和し、2 相分離後、水相を得た。得られた水相を、ロータリー・エバポレーターを用いて 1000 ml まで濃縮し、最終的な抽出液

を得た。

(2—2) ブタ視床下部抽出液のオクタドデシル逆相クロマトグラフィーによる精製

オクタドデシル基を固定したシリカゲル ODS-AM 120-S50 (YMC 社) をメタノールで膨潤後、直径 5 cm のガラスカラムに容量が 130 ml になるように充填し、1 M 酢酸で平衡化した。このカラムに、(2—1) で調製した抽出液 (視床下 500 g 分) を流速 400 ml/h で添着した。続いて、このカラムに、約 500 ml の 1 M 酢酸、次いで約 500 ml の 20% アセトニトリル / 0.1 % トリフルオロ酢酸を、流速 400 ml/h で流し、ゲルを洗浄した。最後に、このカラムに、約 500 ml の 50% アセトニトリル / 0.1 % トリフルオロ酢酸を流速 400 ml/h で流し、目的とする粗ペプチド成分を溶出した。得られた溶出液を、エバポレーターを用いて濃縮した後、凍結乾燥機 (12 EL; VirTis 社) にて凍結乾燥した。

(2—3) ブタ視床下部抽出液の TSKgel ODS80TM 逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel ODS80TM 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム (東ソー株式会社、22.5 mm x 30 cm) を、40°C にて、流速 8 ml/min で A 液 (0.1% トリフルオロ酢酸 / 蒸留水) を流し、平衡化した。上記 (2—2) で得られた凍結乾燥物を、1 M 酢酸に 40 ml に溶解し、各 10 ml ずつ 4 回のクロマトグラフィー操作を行った。即ち、凍結乾燥物の酢酸溶液 10 ml を該カラムに添着した後、流速 8 ml/min で、60 分間かけて A 液 (0.1% トリフルオロ酢酸 / 蒸留水) 容量 80% / B 液 (0.1% トリフルオロ酢酸 / 100% アセトニトリル) 容量 20% から、A 液 (0.1% トリフルオロ酢酸 / 蒸留水) 容量 40% / B 液 (0.1% トリフルオロ酢酸 / 100% アセトニトリル) 容量 60% まで直線的グラジエントで上昇させた。

溶出液を、8 ml ずつフラクション No. をつけて分取し、各 1 ml ずつに分注し真空濃縮機 (サーバント社) で濃縮乾燥させた。この乾燥物に、ジメチルスルフォキサイド 0.03 ml を加えて溶解し、GALR1 および GALR2 活性化作用を測定するアッセイ用サンプルとした。

(2—4)  $[^{35}\text{S}] \text{GTP} \gamma \text{S}$  結合試験による GALR2 (ガラニン・レセプター・タイプ 2) を活性化する化合物の単離と精製

上記 (2—3) で得られたアッセイ用サンプルを、上記 (1—3) に記載した GALR1 また

はGALR2 膜画分を用いる [ $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S 結合試験によりガラニン・レセプター活性化作用を測定した。

GALR1 発現細胞膜画分を用いた [ $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S 結合試験では、フラクション No. 36-39 および No. 42-43 に [ $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S 結合促進活性が認められ、一方、GALR2 発現細胞膜  
5 画分を用いた [ $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S 結合試験では、フラクション No. 36-39, No. 42-43、及び No. 46-49 に [ $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S 結合促進活性が認められた [図 2]。

さらに、アッセイ用サンプルをジメチルスルフォキサイドで 100 倍希釈し、この希釈サンプル 3 ml をブタ・ガラニン・ラジオイムノアッセイキット (Peninsula 社) により分析した結果、フラクション No. 36-38 にガラニン免疫活性が検出された [図 3]。

10 以上の結果より、フラクション No. 36-39 の GALR1 および GALR2 活性化作用を有する成分はブタ・ガラニンであると判断された。一方、フラクション No. 46-49 の GALR2 活性化作用を有する成分はガラニンとは異なる化合物であることが予想された。

(2—5) GALR2 (ガラニン・レセプター・タイプ2) を活性化する化合物の分子量測定

15 公知のゲルろ過高速液体クロマトグラフィー法により、上記 (2—4) で得られた GALR2 活性化成分 (フラクション No. 46-49) の分子量を測定した。

フラクション No. 46-49 のサンプル混合液の 0.02 ml を 0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水 0.08 ml に希釈し、その 0.05 ml を G2000SWXL (東ソー株式会社) カラムに添着し、0.1% トリフルオロ酢酸/10% アセトニトリルを流速 0.5 ml/min で流し、溶出液を各 0.25 ml (0.5 分ごとに) 分取した。分取したフラクションを濃縮乾燥 (SpeedVac Plus SC210A; Savant 社) し、膜画分の懸濁液に直接溶解した後、50 nM [ $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S (New England Nuclear 社) を 2  $\mu$ L 添加し、以下 (1—3) に記載した方法により [ $^{35}$ S] GTP $\gamma$ S 結合量を測定した。

25 その結果、GALR2 活性化作用 ( $[^{35}\text{S}] \text{GTP}\gamma\text{S}$  結合促進活性) を有する成分は、フラクション No. 35 (リテンション・タイム 17~17.5 分) に溶出された [図 4]。同一条件で分析した公知のペプチド (Adrenomedulin, Gastric inhibitory peptide, PACAP38,

Neuropeptide Y,  $\beta$ -endorphine, Galanin, SRIF28(Somatostatin 28), Bovine Serum Albumin, Trypsin inhibitor, Lysozyme) を用いて比較解析した結果〔図5〕、フラクションNo. 46-49 の GALR2 活性化作用を有する成分の分子量は約 5000～約 7000 と推測された。

一方、公知のブタ・ガラニン（ペプチド研究所）の分子量は 3157.4 (リテンション・タイム 18.858 分)である。従って、フラクション No. 46-49 として得られたGALR2活性化作用を有する化合物は、公知のガラニンとは異なる物質であることが示唆された。  
5

### 実施例3 GALR2 (ガラニン・レセプター・タイプ2) 活性化作用を有する化合物の精製

#### 10 (3-1) ブタ視床下部抽出液の調製

大量的視床下部抽出液を調製するために、上記(2-1)の方法を以下のとおり簡略化した。

ブタ視床下部凍結品(東京芝浦臓器株式会社)を50個(約1 kg)を包丁を用いて薄い切片にスライスし、沸騰した 2500 ml の蒸留水を含む 5000 ml ピーカーに加え、10分間煮沸した。煮沸した視床下部をピーカーごと水浴、及び氷浴して、温度を約4℃まで下げ、視床下部を煮沸に用いた蒸留水とともに、ポリトロン・ホモジエナイザーを用いて10分間ホモジエナライズした。得られたホモジエネートに、酢酸 150 ml、および 6N 塩酸を 8 ml 滴下し、それぞれの終濃度を 1 M および 20 mM とし、次に攪拌翼を用いて一晩(約1.6時間)攪拌した。ホモジエネートを高速遠心機(CR26H、日立 RR10A型ローター：日立株式会社)を用いて 8000 rpm、30 分間遠心し、得られた上清を、ガーゼでろ過し、脂質片を取り除いた。以上の操作を4回繰り返し行うことにより、約4 kg の視床下部から抽出液を調製した。  
15  
20  
25

#### (3-2) ブタ視床下部抽出液の濃縮と粗分画

##### (3-2-1) オクタドデシル逆相クロマトグラフィーによる精製

オクタドデシル基を固定したシリカゲル(YMC社、ODS-AM 120-S50)をメタノールで膨潤後、直径 5 cm のガラスカラムに容量が 400 ml になるように充填し、1 M 酢酸で平衡化

した。

このカラムに（3—1）で調製した抽出液の半分量（視床下部2 kg分）を流速400 ml/hで添着した後、流速400 ml/hで、約1000 mlの1 M酢酸、次いで約1200 mlの20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸を流し、ゲルを洗浄した。最後に、流速400 ml/hで、約5 2000 mlの60%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸をカラムに流し、目的とする粗ペプチド画分を溶出した。得られた溶出液を、エバポレーターを用いて濃縮した後、凍結乾燥機（12 EL；VirTis社）にて凍結乾燥した。以上の操作を2回実施し、約4 kg（200個）分の視床下部の抽出液の凍結乾燥粉末を調製した。

（3—2—2）SP-Sephadexイオン交換クロマトグラフィーによる精製

直径5 cmのガラスカラムに、10 mM塩酸中で膨潤させたSP-Sephadex C25（Pharmacia Biotech社）を、容量が120 mlになるよう充填し、100 mM塩酸で洗浄した後、1 M酢酸で平衡化した。（3—2—1）により得られた視床下部抽出液の凍結乾燥粉末を、約800 mlの1 M酢酸に溶解し、平衡化したSP-Sephadex C25カラムに流速400 ml/hで添着した。約600 mlの1 M酢酸、約600 mlの1 Mピリジン、約600 mlの1 Mピリジン・酢酸（pH 5.0）を流速400 ml/hで順次カラムに流し、溶出液を40 mlづつ分取し、これを各0.2 mlづつに分注し真空濃縮機（サーバント社）で濃縮乾燥させた。この乾燥物に、ジメチルスルフオキサイド0.04 mlを加えて溶解し、上記（1—3）の試験法により、GALR2活性化作用を測定した。

その結果、目的とするGALR2活性化作用を有する成分は、1 Mピリジン・酢酸（pH 5.0）により溶出されていることが判明した。本結果より、GALR2活性化作用を有する成分（化合物）は強塩基性物質であると考えられた。

（3—2—3）Sephadex G50ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製

上記（3—2—2）で得られた1 Mピリジン・酢酸（pH 5.0）溶出液分取品をエバポレーターを用いて100 mlになるまで濃縮し、1 M酢酸で平衡化したSephadex G50（Pharmacia Biotech社）カラム（直径6 cm、容量3000 ml）に流速400 ml/hで添着した後、流速400 ml/hで1 M酢酸をカラムに流し、溶出液を33 mlづつフラクションNo.をつけて分取し、これを

各 0.25 ml づつに分注し真空濃縮機 (Savant 社) で濃縮乾燥させた。この乾燥物に、ジメチルスルフォキサイド 0.03 ml を加えて溶解し、上記 (1-3) の試験法により、GALR2 活性化作用を測定した。

その結果、目的とする GALR2 活性化作用を有する成分は主として、分取フラクション No. 66-80 に溶出されていることが判明した。また、フラクション No. 55-65 および No. 45-54 にも弱い活性が検出された。フラクション No. 66-80、55-65 および 45-54 をそれぞれ混合して凍結乾燥した。

(3-3) HPLCを用いるGALR2活性化作用を有する化合物の精製

(3-3-1) TSKgel ODS80TM 逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel ODS80TM 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム (東ソー、22.5 mm x 30 cm) を、40°Cにて、流速 4 ml/min で A 液 (0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水) を流し、平衡化した。

上記 (3-2-3) で得られた Sephadex G50 分取フラクションの各凍結乾燥物を 1 M 酢酸に溶解し、それぞれカラムに添着した後、流速 4 ml/min で、120 分間かけて A 液 (0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水) 容量 67% / B 液 (0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル) 容量 33% から、B 液 (0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル) 容量 100% まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。

溶出液を、8 ml ずつフラクション No. をつけて分取した。なお、フラクション No. 66-80 の凍結乾燥物は 2 回に分けてクロマトグラフィーを実施し、またフラクション No. 55-65、45-54 はそれぞれ 1 回のクロマトグラフィーで分離した。

分取フラクション 4 μl を直接用い、上記 (1-3) の試験法により、GALR2 活性化作用を測定した。その結果、いずれのクロマトグラフィーにおいても主に 3 種の活性ピークが見られた。フラクション No. 35-38 に見られた活性化作用を有する成分の溶出位置は実施例 2 に記載したガラニンの溶出位置にほぼ一致した。また、フラクション No. 47-50 に見られた活性化成分は実施例 2 に記載した GALR2 活性化作用を有する成分 (GALR1 を活性化せず、また前述のブタ・ガラニン・ラジオイムノアッセイ・キットで検出されない) の溶出位置に

ほぼ一致した。従って、フラクション No. 47-50 を用いて GALR2 活性化作用を有する成分の精製を実施することとし、これらフラクションを混合して凍結乾燥した。

(3—3—2) TSKgel CM-2SW イオン交換高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel CM-2SW イオン交換高速液体クロマトグラフィー用カラム(東ソー、0.46 cm x 25 cm)を、20°Cにて、流速1 ml/minでA液(10 mM ギ酸アンモニウム/40% アセトニトリル)を流速1 ml/minで流し、平衡化した。

(3—3—1) 得られた逆相高速液体クロマトグラフィー分取フラクションの凍結乾燥物をA液に溶解し、カラムに添着した後、流速1 ml/minで、60分間かけてA液(10 mM ギ酸アンモニウム/40% アセトニトリル)容量100%から、B液(500 mM ギ酸アンモニウム/40% アセトニトリル)容量100%まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。

溶出液を、0.5 ml づつフラクションNo.をつけて分取した。分取フラクション1 μlを直接用い、上記(1—3)の試験法により、GALR2 活性化作用を測定した。その結果、主な活性ピークはフラクション No. 89-92 に検出された。これらのフラクションをまとめて以降の精製に用いた。

(3—3—3) ジフェニル逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

ジフェニル逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム(Vydak 219TP54、0.46 cm x 25 cm)を、40°Cにて、流速1 ml/minでA液(0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水)を流し、平衡化した。

上記(3—3—2) 得られたイオン交換高速液体クロマトグラフィー分取フラクションを直接カラムに添着した後、流速1 ml/minで1分間でA液(0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水)容量100%からB液(0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル)容量を50%まで急速に上昇させ、これを次に、流速1 ml/minで、60分間かけてB液濃度を100%まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。

溶出液を、1 ml ずつフラクションNo.をつけて分取した。分取フラクション1 μlを直接用い、上記(1—3)の試験法により、GALR2 活性化作用を測定した。その結果、主な活性ピークはフラクション No. 24-26 に検出された。これらのフラクションをまとめて以降の精

製に用いた。

(3—3—4) Super Phenyl 逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel Super Phenyl 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム(東ソー、0.46 cm x 10 cm)を、40°Cにて、流速1 ml/minでA液(0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水)を流し、平衡化した。

(3—3—3) 得られたジフェニル逆相高速液体クロマトグラフィー分取フラクションを直接カラムに添着した後、流速1 ml/minで1分間でA液(0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水)容量100%からB液(0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル)容量45%まで急速に上昇させ、これを次に、流速1 ml/minで、80分間かけてB液濃度を55%まで直線的グラジェントで上昇させ溶出液を回収した。

溶出液を、1 mlずつフラクションNo.をつけて分取した。分取フラクション1 μlを直接用い、上記(1—3)の試験法により、GALR2活性化作用を測定した。その結果、主な活性ピークはフラクションNo. 44—45およびNo. 50—52に検出された。フラクションNo. 44—45を混合して同条件にて再クロマトグラフィー操作を実施し、0.5 mlずつ溶出フラクションを分取した。一方、No. 50、51および52はそれぞれ別個に同条件にて再クロマトグラフィー操作を実施し、0.5 mlずつ溶出フラクションを分取した。

各分取フラクション2 μlを直接使用し、上記(1—3)の試験法により、GALR2活性化作用を測定した。その結果、No. 44—45の再クロマトグラフィー操作で得られたフラクションNo. 93—95、および、フラクションNo. 50の再クロマトグラフィー操作で得られたフラクションNo. 105—107に活性ピークが検出された。フラクションNo. 51の再クロマトグラフィー操作で得られたフラクションNo. 105—107に主たる活性ピークと、フラクションNo. 108—109に弱い活性ピークが検出された。さらに、フラクションNo. 52の再クロマトグラフィー操作で得られたフラクションNo. 106—110には主たる活性ピークがブロードに検出された。

(3—3—5) Super ODS 逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

(3—3—5—1) GALR2活性化主成分の精製

(3—3—5—1—1) トリフルオロ酢酸存在下でのクロマトグラフィー

TSKgel Super ODS 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、0.46 cm x 10 cm）を、40°Cにて、流速1 ml/minでA液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）を流し、平衡化した。

（3—3—4）で得られたSuper Phenyl 逆相高速液体クロマトグラフィ一分取フラクション No93-95 を直接カラムに添着した後、流速 1 ml/min、1分間で、A液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量100%から B液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量を50%まで直線的グラジエントで上昇させ、これを次に流速1 ml/minで、84分間かけてB液濃度を62.5%まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。

溶出液を、0.5 mlずつフラクションNo.をつけて分取した。分取フラクション2 μlを直接用い、上記（1—3）の試験法により、GALR2 活性化作用を測定した。その結果、活性ピークはフラクションNo. 96-97に検出された。

得られたフラクションNo. 96-97を混合して同条件にて再クロマトグラフィー操作を実施し、0.5 mlずつフラクションを分取した。210 nm の紫外（UV）吸収で検出されたピークは単一ではあったが、不純物の混入を示唆するピークの肩が認められた。各分取フラクション2 μlを直接用い、上記（1—3）の試験法により、GALR2 活性化作用を測定した。その結果、活性ピークはフラクションNo. 98-100に検出され、これらは210 nm の紫外吸収で検出されたピーク肩部分を除く部分に一致した。該ピーク肩部分に含まれる不純物を除去するため、（3—3—5—1—2）に記載の方法によりさらに精製を行った。

（3—3—5—1—2）ヘプタフルオロ酢酸存在下でのクロマトグラフィー  
TSKgel Super ODS 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、0.46 cm x 10 cm）を、40°Cにて、流速1 ml/minで A液（0.1% ヘプタフルオロ酢酸/蒸留水）を流し、平衡化した。

（3—3—5—1—1）で得られたフラクションNo98-100を直接カラムに添着した後、流速 1 ml/min、1分間で A液（0.1% ヘプタフルオロ酢酸/蒸留水）容量100%から B液（0.1% ヘプタフルオロ酢酸/100% アセトニトリル）容量を35%まで急速に上昇させ、これを次に流速1 ml/minで、60分間かけてB液濃度を50%まで直線的グラジエントで上昇さ

せ溶出液を回収した。

溶出液を、0.5 ml ずつフラクション No. をつけて分取した。分取フラクション 2  $\mu$  l を直接用い、上記（1-3）の試験法により、GALR2 活性化作用を測定した。その結果、活性ピークはフラクション No. 67-69 に検出された。この活性ピークは、2本に分離された 210 nm の紫外吸収ピークのうち、早く溶出された方の紫外吸収ピークに完全に一致し、単一ペプチドにまで精製されたものと判断した。本活性化作用を有する成分を GALR2 活性化主成分と呼ぶ。

#### （3-3-5-2） GALR2 活性化副成分（1）の精製

TSKgel Super ODS 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、0.46 cm x 10 cm）を、40°Cにて、流速 1 ml/min で A液（0.1% ヘプタフルオロ酪酸/蒸留水）を流し、平衡化した。

（3-3-4）で得られた Super Phenyl 逆相高速液体クロマトグラフィー分取フラクション No. 105-107（フラクション No. 50 由来）、フラクション No. 105-107（フラクション No. 51 由来）、フラクション No. 106-107（フラクション No. 52 由来）を混合し、直接カラムに添着した後、流速 1 ml/min、1 分間で、A液（0.1% トリフルオロ酢酸／蒸留水）容量 100% から B液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量を 52.5%まで急速に上昇させ、これを次に流速 1 ml/min で、84 分間かけて B液濃度を 65%まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を、0.5 ml ずつフラクション No. をつけて分取した。

分取フラクション 2  $\mu$  l を直接用い、上記（1-3）の試験法により、GALR2 活性化作用を測定した。その結果、活性ピークはフラクション No. 75-76 に検出された。得られたフラクション No. 75-76 を混合し、同条件にて再度同じクロマトグラフィーを実施し、0.5 ml ずつフラクション No. をつけて分取した。溶出液は、210 nm の紫外吸収では単一なピークとして検出された。分取フラクション 3  $\mu$  l を直接用い、上記（1-3）の試験法により、GALR2 活性化作用を測定した。その結果、活性ピークはフラクション No. 76-78 に検出された。この活性ピークは 210 nm の紫外吸収ピークと一致し、活性成分は単一ペプチドにまで精製されたものと判断した。本活性化作用を有する成分を GALR2 活性化副成分（1）と呼ぶ。

## (3—3—5—3) GALR2 活性化副成分（2）の精製

TSKgel Super ODS 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー株式会社、0.46 cm x 10 cm）を、40°Cにて、流速1 ml/minでA液（0.1% ヘプタフルオロ酢酸/蒸留水）を流し、平衡化した。

5 (3—3—4) 得られた Super Phenyl 逆相高速液体クロマトグラフィ一分取フラクション No. 108-109(フラクション No. 51 由来)、フラクション No. 108-110(フラクション No. 52 由来) を混和し、直接カラムに添着した後、流速 1 ml/min、1 分間で、A液容量 100 % から B液 (0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル) 容量を 52.5%まで急速に上昇させ、これを次に流速 1 ml/min で、8.4 分間かけて B 液濃度を 65%まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を、0.5 ml ずつフラクション No. をつけて分取した。

分取フラクション 2 μl を直接用い、上記 (1—3) の試験法により、GALR2 活性化作用を測定した。その結果、活性ピークはフラクション No. 79-80 に検出された。

得られたフラクション No. 79-80 を混合して同条件にて再度同じクロマトグラフィーを実施し、0.5 ml ずつ分取したところ、210 nm の紫外吸収で单一なピークとして検出された。

15 分取フラクション 3 μl を直接用い、上記 (1—3) の試験法により、GALR2 活性化作用を測定した。その結果、活性ピークはフラクション No. 79-81 に検出された。この活性ピークは 210 nm の紫外吸収ピークと一致し、活性成分は単一ペプチドにまで精製されたものと判断した。本活性化作用を有する成分を GALR2 活性化副成分（2）と呼ぶ。

## 20 実施例 4 アミノ酸配列分析

## (4—1) GALR2 活性化作用を有する主成分のN末端アミノ酸配列分析

上記 (3—3—5—1—2) で得られたフラクション No. 67-69 の GALR2 活性化主成分を 20 μl の 0.1% トリフルオロ酢酸/30% アセトニトリルに溶解し、ペプチドサポートディスク（ベックマン社）に滴下した後、窒素ガスにより該ディスクを乾燥させた。これをプロテインシーケンサー（ベックマン社、LF3400DT）にセットし、標準分析法（プロシージャ 40）により自動エドマン分解反応を行ないアミノ酸配列解析を行った。各サイクルごとに同定

された PTH アミノ酸を [表1] に示した。

表1

## GALR2 活性化主成分のN末端アミノ酸配列分析結果

サイクル番号	PTHアミノ酸	量 (pmol)
1	A	131
2	P	89.9
3	V	138
4	H	81.7
5	R	47.3
6	G	92.1
7	R	45.6
8	G	72.9
9	G	78.2
10	W	24.1
11	T	24.0
12	L	51.5
13	N	34.0
14	S*	9.3
15	A	25.4
16	G	26.8
17	Y	24.6
18	L	32.4
19	L	43.5
20	G	24.0
21	P	14.6
22	V	17.2
23	L	26.4
24	H	1.4
25	P	16.1
26	P	22.6
27	S*	2.9
28	X	
29	A	11.1
30	E	3.8
31	G	13.0
32	G	19.6
33	G	20.4
34	K	4.4

1) lagを補正していない生データ

2) S\*: PTH-Serの他にその分解物(PTH-dehydroalanin-DTT付加物)も検出された。

3) 28サイクルめではPTHアミノ酸は同定できなかった。

表1より、GALR2 活性化主成分のN末端から 34 残基目までのアミノ酸配列を以下のように決定することができた（28 残基目 X は未同定であることを表す）。

APVHRGRGGWTLNSAGYLLGPVLHPPSXAE<sup>X</sup>GGK (GALR2 活性化主成分のN末端アミノ酸配列、配列番号：11)

5 得られたアミノ酸配列中のN末端から 9 残基～21 残基目の 13 残基からなる配列は、公知のブタ・ガラニンのN末端アミノ酸配列に一致した。しかし、その前後のアミノ酸配列はブタ・ガラニンおよびその前駆体のいずれの配列とも一致しなかった。また、本アミノ酸配列と一致する公知のペプチドは見出されなかつたので、得られた GALR2 活性化主成分は新規ペプチドであると推測された。

10 (4—2) GALR2活性化作用を有する副成分 (1) のN末端アミノ酸配列分析  
上記 (3—3—5—2) で得られたフラクション No. 76-78 の GALR2 活性化副成分は、(4—1) と同様にして分析した。各サイクルごとに同定されたアミノ酸を [表2] に示した

表2

## 副活性成分(1)のN末端アミノ酸配列分析結果

サイクル番号	PTHアミノ酸	量(pmol)
1	A	50.7
2	P	36.7
3	V	51.3
4	H	31.4
5	R	18.8
6	G	38.9
7	R	17.2
8	G	32.2
9	G	32.5
10	W	9.7
11	T	9.2
12	L	19.0
13	N	13.9
14	S*	3.6
15	A	12.2
16	G	12.0
17	Y	10.9
18	L	15.0
19	L	18.7
20	G	9.9
21	P	6.8
22	V	7.5
23	L	11.4
24	H	-**
25	P	7.0
26	P	9.7
27	S*	1.2
28	X	
29	A	5.3
30	E	2.3
31	G	6.4
32	G	7.4

- 1) lagを補正していない生データ
- 2) S\*: PTH-Serの他にその分解物(PTH-dehydroalanin-DTT付加物)も検出された。
- 3) 24サイクルめではPTH-Hisのピークを認めたが、定量限界下であった。
- 4) 28サイクルめではPTHアミノ酸は同定できなかった。

表2より、GALR2 活性化副成分(1)のN末端から32残基目までのアミノ酸配列を以下のように決定することができた(28残基目Xは未同定であることを表す)。

APVHRGRGGWTLNSAGYLLGPVLHPPSXAE<sub>G</sub>  
号: 12)

このアミノ酸配列は上記(4-1)で得られたGALR2活性化主成分のN末端アミノ酸配列32残基に完全に一致した。

(4-3) GALR2活性化作用を有する副成分(2)のN末端アミノ酸配列分析

上記(3-3-5-3)で得られたフラクションNo.79-81のGALR2活性化副成分(2)を、20μlの0.1%トリフルオロ酢酸/30%アセトニトリルに溶解し、重炭酸アンモニウム(終濃度1%)、TLCK-キモトリプシン(終濃度10pmolシグマ社)および蒸留水を添加して50μlとし、37℃で1時間反応させた。

Spheri-5 RP-18逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム(ブラウンリー社、2.1mm×30mm)を、25℃にて、流速300μl/minでA液(0.1%トリフルオロ酢酸)を流し、平衡化した。

酵素反応液全量をカラムに添着した後、流速300μl/minで、30分間かけてA液(0.1%トリフルオロ酢酸)容量100%からB液(0.1%トリフルオロ酢酸/70%アセトニトリル)容量を70%まで上昇させ、210nmの紫外吸収を示す溶出ピーク4つ(CHY-1、CHY-2、CHY-3およびCHY-4)を溶出フラクションとして回収した。

分取した4つのフラクション(キモトリプシン消化断片)を、窒素気流下で50μl以下になるまで濃縮した後、(4-1)と同様にしてプロテインシーケンサーによりN末端アミノ酸配列分析を行なった。なお、CHY-3については、ベックマン社LF3400DTプロテインシーケンサーを、CHY-1、CHY-2、およびCHY-4については、アプライドバイオシステムズ社477Aプロテインシーケンサーを使用した。

N末端アミノ酸配列解析により以下の配列が得られた。

CHY-1: APVHRGRGG(配列番号: 13)

CHY-2: XAIDGLPYQPQS(Xは未同定)(配列番号: 16)

CHY-3: LLGPVLHPPSXAE<sup>X</sup>GGGKTALGILDL (Xは未同定) (配列番号: 15)

CHY-4: TLNSAG (配列番号: 14)

上記(4-1)で得られたGALR2活性化主成分または上記(4-2)で得られたGALR2活性化副成分(1)のN末端アミノ酸配列結果を参考にして、GALR2活性化副成分(2)は次のN末端アミノ酸配列を有しているものと推測された。

APVHRGRGGWTLNSAGYLLGPVLHPPSXAE<sup>X</sup>GGGKTALGILDL (配列番号: 17)

#### 実施例5 ブタ型リガンドペプチド(1-60)をコードするcDNA

1) デジエネレートPCR (Degenerated PCR) 法によるブタ GALR2 活性化因子遺伝子断片のクローニング

ブタ全脳から TRIZOL reagent (Gibco BRL 社) を用い、添付されたマニュアルに記載された方法に従って total RNA を抽出した。次いでオリゴ dT セルロースカラム (mRNA Purification Kit, Pharmacia 社) を用い、添付されたマニュアルに記載された方法に従つて該 total RNA から poly(A)<sup>+</sup>RNA を調製した。さらに、3' RACE System for rapid amplification 15 of cDNA ends (Gibco BRL 社) を用い、添付されたマニュアルに記載された方法に従つて、該 Poly (A)<sup>+</sup>RNA から first strand cDNA を合成した。また、ブタ GALR2 活性化成分の部分アミノ酸配列を基にデザインした次の degenerate primer を合成した。

pGAL4-7F: 5'-CAYMNGGIMGN<sup>G</sup>GIGG<sup>T</sup>GGAC-3' (配列番号: 20)

pGAL9-3F: 5'-GGHTGGACNCTNAAYAGYGC-3' (配列番号: 21)

20 pGAL34-1R: 5'-ATICC<sup>N</sup>A<sup>G</sup>I<sup>C</sup>G<sup>N</sup>GTYTTICCYTT-3' (配列番号: 22)

前述の first strand cDNA を鋳型として用い、pGAL4-7F および pGAL34-1R をプライマーとして用いて初段の PCR 反応を実施した。該 PCR 反応における反応液は、Taq polymerase (宝酒造株式会社) を 0.5 μl、それぞれ添付の 10x PCR buffer (500 mM KCl-100 mM Tris · HCl, pH 8.3) を 10 μl、25 mM MgCl<sub>2</sub> を 6 μl、2.5 mM dNTP mixture を 8 μl、プライマー-pGAL4-7F およびプライマー-pGAL34-1R (ともに 10 μM) を各 10 μl、および該鋳型 cDNA (前述の first strand cDNA) を 8 μl、蒸留水を 47.5 μl を混合して作製した。該 PCR

として、1) 初期変性 (94°C・30 秒間)、2) 32回のサイクル反応 (94°C・20 秒間-55°C・30 秒間-72°C・30 秒間) の後3) 最終伸長反応 (72°C・4 分間) を行い初段 PCR 産物を得た。

得られた初段 PCR 産物を錆型として第2段の PCR 反応 (nested PCR) を行った。該反応液は、Taq polymerase (宝酒造株式会社) を 0.5 μl、添付の 10x PCR buffer (500 mM KCl-100 mM Tris・HCl, pH 8.3) を 10 μl、25 mM MgCl<sub>2</sub> を 6 μl、2.5 mM dNTP mixture を 8 μl 5 、プライマー pGAL9-3F および pGAL34-1R (ともに 10 μM) を各 10 μl、および該錆型 cDNA (初段 PCR 産物) を 5 μl、蒸留水を 50.5 μl を混合して作製した。該 PCR として、1) 初期変性 (94°C・30 秒間)、2) 32回のサイクル反応 (94°C・20 秒間-55°C・30 秒間-72°C・30 秒間) の後3) 最終伸長反応 (72°C・10 分間) を行い nested PCR 産物を得た。

10 さらに nested PCR 産物を 2.0% アガロースゲル電気泳動を行い、サイバーグリーン染色される約 100 bp のバンドを含むゲル片を剃刀で切り出した。該ゲル片より Gene Clean DNA 抽出キット (BIO 101 社) を用いて nested PCR 産物である DNA 断片を回収した。この DNA 断片を TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen 社) を用いて、添付のマニュアルに記載された方 15 法に従ってキットに添付されたプラスミドベクター pCRII に連結した。得られたプラスミドを QIAwell 8 Ultra plasmid purification kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。該プラスミド中の nested PCR 産物の塩基配列決定のための反応は、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems、パーキンエルマー社) を用いて行い、蛍光式自動シ ークエンサー (DNA sequencer Prism 377: Applied Biosystems、パーキンエルマー社) を用いて nested PCR 産物の塩基配列を解読した。その結果、ブタ GALR2 活性化因子の部分ペプ 20 チドをコードする 98 bp の DNA 断片を有する数種類のプラスミドを得ることができた。PCR 反応に degenerate primers を用いたため、これらの数種類のプラスミドにおける DNA はプ ライマーに対応する部分で塩基配列に差異が見られた。以下に代表的な 2 クローン、 pCR100-6 および pCR100-7 中の nested PCR 産物の塩基配列を示す。

pCR100-6 :

25 GGCTGGACTT TAAATAGTGC TGGTTACCTC CTGGGTCCCG TACTCCATCC GCCCTCCAGG  
GCTGAAGGAG GCGGGAAGGG CAAAACAGCC CTGGGCAT (配列番号 : 23)

pCR100-7 :

GGTTGGACTT TGAACAGTGC TGGTTACCTC CTGGGTCCCCG TACTCCATCC GCCCTCCAGG

GCTGAAGGAG GCGGGAAGGG CAAAACCGCC CTAGGCAT

(配列番号 : 24)

5 2) ブタ型リガンドペプチド (1 - 60) をコードする cDNA のクローニング

ブタ全脳より得られた前述の poly (A)<sup>+</sup> RNA より、ZAP-cDNA Gigapack III Gold cloning kit (STRATAGENE 社) を用いて、ブタ全脳 cDNA ファージライブラリーを作製した。方法はキットに添付されたマニュアルに従った。得られたファージ (2, 200, 000 plaque forming units) を該マニュアルの方法で大腸菌 XL1-Blue MRF' (STRATAGENE 社) に感染させた後、NZY 培地ア  
10 ガープレート 120 枚にまき、37°C で 8 時間培養した。得られた大腸菌プラークよりファージを Hybond-N+ナイロンメンブレン (アマシャム社) に写し取った。このナイロンメンブレンを 1.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.5 N 水酸化ナトリウム溶液、1.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.5 M トリス緩衝溶液 (pH 7.0)、および 2 x SSC 液に順次浸した後、風乾させた。

得られたナイロンメンブレンをハイブリダイゼーション緩衝液 (5x SSPE, 5x Denhardt's 液、0.5% SDS, 0.1 mg/ml サケ精子 DNA) 中にて 60°C に 24 時間保温し、次いで、ハイブリダイゼーションプローブ ( $5 \times 10^5$  cpm/ml) を含むハイブリダイゼーション緩衝液 (同上) 中にて、60°C に 24 時間保温した。該ハイブリダイゼーションプローブは、前述のプラスミド pCR100-6 と pCR100-7 の 1:1 混合物を鋳型として、次に示す 2 個のプライマー-pGAL9-3F および pGAL34-8R により増幅した DNA 断片を用いた。

20 pGAL9-3F: 5'-GGHTGGACNCTNAAYAGYGC-3' (配列番号 : 25)

pGAL34-8R: 5'-ATDCCBAGGGCDGTTTGCCCTT-3' (配列番号 : 26)

即ち、該増幅反応 [反応液組成は、ExTaq (宝酒造株式会社) を 0.5 ml、添付の 10x Ex Taq buffer (20 mM MgCl<sub>2</sub> を含む。) を 5 μl、2.5 mM dNTP mixture を 4 μl、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (6000 Ci/mmol) を 10 μl、プライマー-pGAL9-3F および pGAL34-8R (それぞれ 10 μM) を各 0.5 μl、および鋳型 cDNA を 1 μl、蒸留水を 29 μl を混合して作製] として、96°C・30 秒間の初期変性後、94°C・20 秒間-55°C・30 秒間-72°C・30 秒間のサイクル反応を 32 回、および 72

約4分間の最終伸長反応を行い增幅DNA断片を得た。

該ハイブリダイゼーション反応後のナイロンメンブレンを、0.1% SDS を含む 0.2x SSC 緩衝液を用いて 50°C にて 30 分間洗浄した後、X 線フィルム (Kodak 社、BioMax MS) を用いて増感スクリーンの存在下でオートラジオグラフィーに処した (曝露条件 : -70°C、3 日間)。該オートラジオグラフィーの結果から検出された陽性プラークを単離し、クロロフォルム 0.1 ml を含む SM 緩衝液 (100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.01% gelatin, 50 mM Tris・HCl, pH 7.5) 5 ml 中にファージを抽出した。

得られたファージを再度大腸菌 XL1-Blue MRF'に感染させた後、NZY 培地アガープレートにまき、37℃で8時間培養した。得られた大腸菌プラークよりファージをナイロンメンブレン（アマシャム社、Hybond-N+）に写し取り、前述と同様の方法によりハイブリダイゼーションを行った。オートラジオグラフィーにより、陽性の単一クローンを単離し、前述と同様の一連の操作をもう一度繰り返し実施し、完全に単一なファージクローンを取得した。

次に、該ファージクローニングからプラスミドを以下の方法で単離精製した。ファージ液 (1 μl) を大腸菌 XPORT (50 μl)、ヘルパーファージ (10 μl)、大腸菌 XLOLR (5 μl) と混合し、NZY アガープレートにまき、37°Cで8時間培養した。大腸菌 XPORT プラーク中に生じた大腸菌 XLOLR の小コロニーをつま楊枝でピックアップし、アンピシリンとテトラサイクリンを含むLB培地アガープレートにて37°C、一晩培養した。單一コロニーより大腸菌 XLOLR をピックアップし、LB培地中にて液体培養した。培養終了後、大腸菌 XLOLR を集菌し、プラスミド精製キット (キアゲン社、QIAwell 8 Ultra) を用いてプラスミドを精製した。

20 該プラスミド中のブタ GALR2 活性化因子をコードする cDNA の塩基配列決定のための反応  
は、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems、パーキンエルマー社) を  
用いて行い、蛍光式自動シークエンサー (DNA sequencer Prism 377 : Applied Biosystems  
、パーキンエルマー社) を用いてブタ GALR2 活性化因子をコードする cDNA の塩基配列を解  
読した。その結果、ブタ GALR2 活性化因子の全長ペプチドをコードする 974 bp の DNA 断片  
25 を有するプラスミド pGR2PL6、および 1007 bp の DNA 断片を有するプラスミド pGR2PL3 を得  
ることができた。両者の DNA 配列によりコードされる GALR2 活性化因子の前駆体の鎖長およ

びアミノ酸配列には大きな差異が見られたが、プロセシングにより產生されると予想される成熟活性化因子 (mature peptide) 部分の配列は同一であった。

得られた 2 個のプラスミドを公知の方法により大腸菌 TOP10 に導入し、形質転換体それぞれ TOP10/pGR2PL6、TOP10/pGR2PL3 を得た。

5

実施例 6 ブタ型リガンドペプチド (1 - 60) : Ala-Pro-Val-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Val-Leu-His-Pro-Pro-Ser-Arg-Ala-Glu-Gly-Gly-Lys-Gly-Lys-Thr-Ala-Leu-Gly-Ile-Leu-Asp-Leu-Trp-Lys-Ala-Ile-Asp-Gly-Leu-Pro-Tyr-Pro-Gln-Ser-Gln-Leu-Ala-Ser (配列番号 : 31) の製造

市販 Boc-Ser(Bzl)1-OCH<sub>2</sub>-PAM 樹脂 (0.73 mmole/g resin) 0.5 mmole 分をペプチド合成機 ABI 430A の反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で Boc-Ala, Boc-Leu, Boc-Gln, Boc-Ser(Bzl), Boc-Pro, Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Gly, Boc-Asp(OcHex), Boc-Ile, Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Trp(CHO), Boc-Thr(Bzl), Boc-Glu(OcHex), Boc-Arg(Tos), Boc-His(Bom), Boc-Val, Boc-Asn, を所望のアミノ酸配列順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得た。この樹脂 0.105 g を p-クレゾール 1.1 g、1,4-ブタンジオール 1.2 ml と共に無水弗化水素 10 ml 中、0°C 60 分攪拌した後、弗化水素を減圧留去し、残留物ヘジエチルエーテルを加え沈殿を濾過した。この沈殿に 50% 酢酸水を加え抽出し、不溶部分を除き、抽出液を十分に濃縮後、50% 酢酸水で充填したセファデックス®G-25 カラム (2.0 x 80 cm) に付し、同溶媒で展開、主要画分を集め LiChroprep® RP-18 を充填した逆相クロマトカラム (2.6 x 60 cm) に付け 0.1%TFA 水 200ml で洗浄、0.1%TFA 水 300ml と 0.1%TFA 含有 50% アセトニトリル水 300ml を用いた線型勾配溶出を行い、主要画分を集め濃縮、凍結乾燥し白色粉末 3.9 mg を得た。これを更に CM-セルロファイン®を充填したイオン交換クロマトカラムに付け 50mM から 200mM 酢酸アンモニウム濃度の線形勾配溶出を行い主要画分を集め凍結乾燥を繰り返し、白色粉末 10mg を得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 6204.7 (計算値 6205.2)

HPLC 溶出時間 21.8 分

## カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液-0.1% TFA水、B液-0.1%TFA含有アセトニトリルを用い A/B : 95/5~45/55

へ直線型濃度勾配溶出（25分）

5 流速：1.0 ml / 分

実施例7 ラット型リガンドペプチド（1-60）：Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-

Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Val-Leu-His-Leu-Ser-Ser-Lys-

Ala-Asn-Gln-Gly-Arg-Lys-Thr-Asp-Ser-Ala-Leu-Glu-Ile-Leu-Asp-Leu-Trp-Lys-Ala-Ile-

10 Asp-Gly-Leu-Pro-Tyr-Ser-Arg-Ser-Pro-Arg-Met-Thr（配列番号：33）およびヒト型リガンドポリペプチド（1-60）：

Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Val-Leu-His-Leu-Pro-Gln-Met-Gly-Asp-Gln-Asp-Gly-

Lys-Arg-Glu-Thr-Ala-Leu-Glu-Ile-Leu-Asp-Leu-Trp-Lys-Ala-Ile-Asp-Gly-Leu-Pro-Tyr-

Ser-His-Pro-Pro-Gln-Pro-Ser（配列番号：34）の製造

15 市販 Boc-Thr(Bzl)I-OCH<sub>2</sub>-PAM樹脂を用い実施例1と同様に合成と精製を行い取得できる。

実施例8 モノクロナル抗体作製に用いた抗原ペプチド Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-

Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub>（配列番号：44のアミド体）の製造

市販 p-メチルMBH樹脂（0.77 mmole/g resin）を用い実施例1と同様に Boc-Cys(MeBzl),

20 Boc-Gly, Boc-Arg(Tos), Boc-His(Bom), Boc-Ala, Boc-Pro を所望のアミノ酸配列順に縮合

、弗化水素処理、50%酢酸水で充填したセファデックス®G-25カラム（2.0 x 80 cm）で精

製の後凍結乾燥し、白色粉末50mgを得た。

質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 980.5(計算値 980.5)

HPLC 溶出時間 5.2分

## 25 カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液—0.1% TFA 水、B液—0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い B液濃度 0 から 50% へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速：1.0 ml / 分

5 実施例 9 Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly (配列番号：35) を含む免疫原の作製

上記実施例 8 で得られた Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub> (配列番号：44 のアミド体) で表示のペプチドと Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) との複合体を作製し、免疫原とした。すなわち、KLH 20 mg を、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 1.4 ml に溶解させ、N-(γ-マレイミドブチリロキシ) サクシニミド (GMB S) 2.2 mg (8 μmol) を含む DMF 溶液 100 μl と混合し、室温で 40 分反応させた。反応後、セファデックス G-25 カラムで分画したのち、マレイミド基の導入された KLH 1.5 mg と Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub> (配列番号：44 のアミド体) で表示のペプチド 1.6 mg とを混合し、4°C で 2 日間反応させた。反応後、生理食塩水に対し、4°C で 2 日間透析した。

15

実施例 10 免疫

6～8 週令の BALB/C 雌マウスに上記実施例 9 記載の免疫原 Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys(-NH<sub>2</sub>) - KLH 複合体を、約 30 μg / 匹を完全フロイントアジュvant とともに皮下免疫した。以後 3 週間おきに同量の免疫原を不完全フロイントアジュvant とともに 2 回追加免疫した。

実施例 11 酵素標識化抗原の作製

西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) 標識化 Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub> (配列番号：44 のアミド体) で表示のペプチドの作製

25 上記実施例 8 で得られた Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub> (配列番号：44 のアミド体) で表示のペプチドと HRP (酵素免疫測定法用、ベーリングガーマンハイム社製

）とを架橋し、酵素免疫測定法（EIA）の標識体とした。すなわち、HRP 6 mg (1 50 nmol) を 0.95 ml の 0.1 M リン酸緩衝液、pH 6.5 に溶解させ、GMB S 0.42 mg (1.5 μmol) を含む DMF 溶液 50 μl と混合し、室温で 30 分間反応させたのち、セファデックス G-25 カラムで分画した。このようにして作製した、マレイミド基の導入された HRP 4.2 mg (105 nmol) と実施例 9 で作製された Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub> (配列番号：44 のアミド体) で表示のペプチド 0.31 mg (315 nmol) とを混合し、4°C で 1 日反応させた。反応後ウルトロゲル AcA 44 (LKB-ファルマシア社製) カラムで分画し、HRP 標識化 Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub> を得た。

10

実施例 12 Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys (-NH<sub>2</sub>) - KLH 複合体を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

上記実施例 9 で得られた Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys (-NH<sub>2</sub>) - KLH 複合体を免疫中のマウス抗血清中の抗体価を以下の方法により測定した。抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートを作製するため、まず抗マウスイムノグロブリン抗体 (IgG 画分、カッペル社製) を 100 μg/ml 含む 0.1 M 炭酸緩衝液、pH 9.6 溶液を 96 ウェルマイクロプレートに 100 μl ずつ分注し、4°C で 24 時間放置した。次に、プレートをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.4) で洗浄したのち、ウェルの余剰の結合部位をふさぐため 25% ブロックエース (雪印乳業社製) を含む PBS を 300 μl ずつ分注し、4°C で少なくとも 24 時間処理した。

上記、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルにバッファー C [1% BSA、0.4 M NaCl、および 2 mM EDTA を含む 0.02 M リン酸緩衝液、pH 7.0] 50 μl、バッファー C で希釈した Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Cys (-NH<sub>2</sub>) - KLH 複合体抗血清 100 μl を加え 4°C で 16 時間反応させた。次に、該プレートを PBS で洗浄したのち、上記実施例 11 で作製した HRP 標識化 Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub> (バッファー C で 500 倍希釈) 100 μl を加え室

温で1日反応させた。次に、該プレートをP B Sで洗浄したのち、固相上の酵素活性をT M Bマイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム (KIRKEGAARD&PERRY LAB, INC、フナコシ薬品取り扱い) 100 μlを加え室温で10分間反応させることにより測定した。反応を1 Mリン酸100 μlを加え停止させたのち、450 nmの吸収をプレートリーダー (B I C 5 HROMAT I C、大日本製薬社製) で測定した。結果を〔図7〕に示す。免疫した8匹のマウス全てに Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Cys (-NH<sub>2</sub>) -KLH複合体に対する抗体価の上昇が認められた。

実施例13 ラット型リガンドペプチド (1-60) (配列番号: 33) のモノクローナル  
10 抗体の作製

比較的高い抗体価を示したマウスに対して200~300 μgの免疫原を生理食塩水0.25~0.3 mlに溶解させたものを静脈内に接種することにより最終免疫を行なった。最終免疫3~4日後のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュで圧迫、ろ過し、イーグルズ・ミニマム・エッセンシャルメディウム (MEM) に浮遊させ、脾臓細胞浮遊液を得た。細胞融合に用いる細胞として、BALB/Cマウス由来ミエローマ細胞P 3-X 63. A 15 g 8. U 1 (P 3 U 1) を用いた [カレント トピックス イン マイクロバイオロジー アンド イムノロジー、81、1 (1978)]。細胞融合は、原法 [ネイチャー、256、495 (1975)] に準じて行なった。すなわち、脾臓細胞およびP 3 U 1をそれぞれ血清を含有しないMEM で3度洗浄し、脾臓細胞とP 3 U 1数の比率を10:1になるよう混合して、800回転で 20. 15分間遠心を行なって細胞を沈殿させた。上清を充分に除去した後、沈殿を軽くほぐし、45%ポリエチレングリコール (PEG) 6000 (コッホライト社製) を0.3 ml加え、37°C温水槽中で7分間静置して融合を行なった。融合後細胞に毎分2 mlの割合でMEMを添加し、合計15 mlのMEMをえた後600回転15分間遠心して上清を除去した。この細胞沈殿物を10%牛胎児血清を含有するG I T メディウム (和光純薬) (G I T-1 25 0% FCS) にP 3 U 1が1 ml当り $2 \times 10^5$ 個になるように浮遊し、24穴マルチディッシュ (リンプロ社製) に1ウェル1 mlずつ192ウェルに播種した。播種後、細胞を3

7°Cで5%炭酸ガスインキュベーター中で培養した。24時間後HAT（ヒポキサンチン $1 \times 10^{-4}$  M、アミノブテリン $4 \times 10^{-7}$  M、チミジン $1.6 \times 10^{-3}$  M）を含んだGIT-10%FCS培地（HAT培地）を1ウェル当たり $1\text{mL}$ ずつ添加することにより、HAT選択培養を開始した。HAT選択培養は、培養開始3、6、9日後に旧液を $1\text{mL}$ 捨てたあと、 $1\text{mL}$ のHAT培地を添加することにより継続した。ハイブリドーマの増殖は、細胞融合後9～14日で認められ、培養液が黄変したとき（約 $1 \times 10^6$ セル/ $\text{mL}$ ）、上清を採取し、実施例5に記載の方法に従って抗体価を測定した。

Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Cys (-NH<sub>2</sub>) - KLH複合体を免疫したマウス由来のハイブリドーマのスクリーニングの典型例として、マウスNo. 8（図7参照）を用いて得られた結果を〔図8〕に示した。

次に、これらの高い抗体価を示したハイブリドーマを限界希釀法によるクローニングに付した。クローニングに際しては、フィーダー細胞としてBALB/Cマウスの胸腺細胞をウェル当たり $5 \times 10^5$ 個になるように加えた。クローニング後、ハイブリドーマを、あらかじめミネラルオイル $0.5\text{mL}$ を腹腔内投与されたマウス（BALB/C）に $1 \sim 3 \times 10^6$ セル/匹を腹腔内投与したのち、6～20日後に抗体含有腹水を採取した。

モノクローナル抗体は得られた腹水よりプロテイン-Aカラムにより精製した。即ち、腹水 $6 \sim 20\text{mL}$ を等量の結合緩衝液（3.5M NaCl、0.05%NaN<sub>3</sub>を含む1.5Mグリシン、pH 9.0）で希釀したのち、あらかじめ結合緩衝液で平衡化したリコンビナントプロテイン-Aーアガロース（Repligen社製）カラムに供し、特異抗体を溶離緩衝液（0.05%NaN<sub>3</sub>を含む0.1Mクエン酸緩衝液、pH 3.0）で溶出した。溶出液はPBSに対して4°C、2日間透析したのち、0.22μmのフィルター（ミリポア社製）により除菌濾過し4°Cあるいは-80°Cで保存した。モノクローナル抗体のクラス・サブクラスの決定に際しては、精製モノクローナル抗体結合固相を用いるエンザイムリンクトイムソーベントアッセイ（ELISA）法を行った。すなわち、抗体 $2\mu\text{g/mL}$ を含む0.1M炭酸緩衝液、pH 9.6溶液を96ウェルマイクロプレートに $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、4°Cで24時間放置した。上記実施例12で述べた方法に従って、ウェルの余剰の結合部位をブ

ロックエースでふさいだのち、アイソタイプタイピングキット (Mouse-Typer™ Sub-Isotyping Kit バイオラッド社製) を用いるELISAによって固相化抗体のクラス、サブクラスを調べた。

#### 5 実施例14 競合法酵素免疫測定法 (競合法-EIA)

Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys (-NH<sub>2</sub>) - KLH複合体を免疫原として作製したモノクローナル抗体の反応特異性を以下の方法により調べた。まず、各モノクローナル抗体溶液の抗体価を実施例12に記載の方法により調べ、競合法-EIAに用いる抗体濃度として、標識体の結合量が飽和結合量の約50%となる抗体濃度 (約30~50ng/ml) 10 を決定した。次に、上記実施例12に記載の抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに、決定された濃度にバッファーCで希釈された抗体溶液50μl、Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub> (配列番号: 44のアミド体)、ブタ型リガンドペプチド (1-60) (配列番号: 31) およびラット型ガラニン (配列番号: 61) の0.05% C HAPSを含むバッファーC溶液50μl、および上記実施例11に記載のHRP標識化 15 Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub> (バッファーCで250倍希釈) を50μl 加え、4°Cで16時間反応させた。反応後、PBSで洗浄したのち固相上の酵素活性を上記 実施例12に記載の方法により測定した。結果を表3に示す。

表3

Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly-Cys-NH<sub>2</sub> (配列番号: 44 のアミド体) ペプチドに対するモノクローナル抗体の反応性

5

## 反応性 1)

10

ハイブリドーマ株 No.	配列番号:44 (配列番号:31)	ブタ型リガンド (配列番号:61)	ラットガラニン (配列番号:61)	クラス/サブクラス	備考
1	+	-	-	IgGM, κ	
2	+	+	-	IgG1, κ	
3	+	±	-	IgG2b, κ	GR2-1N
4	+	+	-		
5	+	±	-	IgG2b, κ	
6	+	+	-		
7	+	-	-		
8	+	-	-		

20

1) 100 nMの抗原 [配列番号:44、配列番号:31、配列番号:61] が存在した時

+ :  $(B/B_0) < 0.50$

± :  $0.50 \leq (B/B_0) < 0.80$

- :  $0.80 \leq (B/B_0)$

ただし、B : 抗原存在時の抗体に結合した HRP 標識化配列番号:44量

25

B<sub>0</sub> : 抗原非存在時の抗体に結合した HRP 標識化配列番号:44量

典型例として、ブタ型リガンドペプチド（1-60）（配列番号：31）に対して最も高い反応性を示したモノクローナル抗体GR 2-1N（IgG<sub>2b</sub>, κ）の競合法-EIAの結果を〔図9〕に示す。GR 2-1Nは、Cys-Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly（配列番号：44）、ブタ型リガンドペプチド（1-60）（配列番号：31）に対して同程度の反応性を有し、ラット型ガラニン（配列番号：61）と反応しないことがわかる。GR 2-1Nのブタ型リガンドペプチド（1-60）（配列番号：31）の標準曲線から、 $(B/B_0) = 0.5$ を与えるブタ型リガンドペプチド（1-60）（配列番号：31）濃度は、6 nM、4.95 ng/well であり、その検出感度は、約0.1 nM [ $(B/B_0) = 0.8$ ]であることが分かった。したがって、GR 2-1Nを用いた競合法EIAは、配列番号X（ラットガラニン）と交差反応することなく、Ala-Pro-Ala-His-Arg-Gly-Arg-Gly-Gly を有するラット型リガンドペプチド（配列番号：33）、ブタ型リガンドペプチド（1-60）（配列番号：31）またはヒト型リガンドペプチド（配列番号：44）を約0.1 nMまで特異的に測定することが可能である。

### 15 実施例15 ブタ型リガンドペプチド（1-34）（配列番号：11）の調製

5 nmolのブタ型リガンドペプチド（1-60）は16%のアセトニトリルを含有する1% 重炭酸アンモニウム 250 μl の反応液中 50 pmol のリシリエンドペプチダーゼ（和光純薬社製）と37℃で3.5時間保温した。

Spheri-5 RP-18 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（ブラウンリー社製、2.1 mm × 30 mm）はあらかじめA液（0.1%トリフルオロ酢酸）を流速 300 μl/min で流し、25℃にて平衡化しておく。酵素反応液をカラムに打ち込んだ後、流速 300 μl/min を保ちながら、30分間かけてB液（0.1%トリフルオロ酢酸/70% アセトニトリル）濃度を70%まで上昇させる。溶出液は210nmの吸光度でモニターし、ピークは手動で分取した。

20. 2分に溶出したピークフラクションは質量分析でM+H<sup>+</sup> 346.5を与える、アミノ酸分析からもブタ型リガンドペプチド（1-60）の断片リガンドペプチド（1-34）であることが確認された。

### 実施例16 ブタ型リガンドペプチド(1-30) (配列番号: 43) の調製

5 nmolのブタ型リガンドペプチド(1-60)は8%のアセトニトリルを含有する1%重炭酸アンモニウム250μlの反応液中50 pmolのエンドプロテイナーゼG 1 u-C (ベ  
5 リンガーマンハイム社製)と37°Cで6時間、次いで25°Cで13時間保温した。

酵素反応液はブタ型リガンドペプチド(1-34)の場合と同様の条件で分離した。

19. 8分に溶出したピークフラクションは質量分析でM+H<sup>+</sup> 3167.2を与える、アミノ酸分析からもブタ型リガンドペプチド(1-60)の断片リガンドペプチド(1-30)であることを確認した。

10

### 実施例17 [<sup>125</sup>I]ラットガラニンを用いたガラニン・レセプター結合実験

上記(1-2)で調製した膜画分を、濃度が13 μg/ml (GALR1 膜画分の場合) または15 μg/ml (GALR2 膜画分の場合) になるように、0.1% ウシ血清アルブミン(BSA)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM フェニルメチルサルフォニルフルオライド、20 μg/ml ロイペプチド、10 μg/ml ペプスタチン、8 μg/ml E-64 を含む50 mM トリス緩衝液(pH 7.3)に懸濁し、各0.1 ml ごとポリプロピレン製小試験管(Falcon 2053)に分注した。分注した膜画分に、5 nM [<sup>125</sup>I] ラットガラニン (New England Nuclear) を4 μl、および可変濃度(100 μM から100 pM のジメチルサルフォキシド溶液)の本発明ペプチド合成品(ブタ型リガンドペプチド(1-60) (配列番号: 31)、本発明ペプチド合成品の限定分解物(ブタ型リガンドペプチド(1-30) (配列番号: 43)、ブタ型リガンドペプチド(1-34) (配列番号: 11)、あるいはラットガラニン(ペプチド研究所社製) (配列番号: 61) 1 μl を添加し、25°Cで60分間反応した。該反応液に、1.5 ml の0.05% 3-[3-コールアミドプロピル]ジメチルンモニオ]プロパンスルфон酸(CHAPS)、0.1% BSA、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA を含む50 mM トリス緩衝液(pH 7.4)を加え、GF/F ガラス繊維ろ紙(ワットマン社製)でろ過した。このろ紙を、1.5 ml の同緩衝液で洗浄した後、ガンマー・カウンターにより放射活性を計測した。

100 μM ラットガラニン 1 μl を添加した際に得られた結合量を非特異的結合量(NSB)、またジメチルサルフォキシド 1 μl を添加した際に得られた結合量を最大結合量( $B_0$ )とし、最大特異的結合量( $B_0$ -NSB)を 50 %に阻害するペプチドの濃度  $IC_{50}$  を求めた(表4)。

5 表4

	ラットGALR1での $IC_{50}$ (nM)	ラットGALR2での $IC_{50}$ (nM)
配列番号:31 ブタ(1-60)	4.1	1.5
配列番号:43 ブタ(1-30)	4.3	1.4
配列番号:11 ブタ(1-34)	実施せず	1.4
配列番号:61 ラットガラニン	0.25	0.71

#### 実施例18 ラット型リガンドペプチド(1-60)をコードするcDNAのクローニング

実施例5と同様の方法により、ラット視床下部から TRIZOL reagent (Gibco BRL 社製)を用いて total RNA を調製した。該 total RNA からオリゴ dT セルロースカラム(mRNA

10 Purification Kit, Pharmacia 社)を用いて poly (A)<sup>+</sup> RNA を精製した。該 poly (A)<sup>+</sup> RNA から ZAP-cDNA Gigapack III Gold cloning kit (Stratagene 社製)を用いて、ラット視床下部 cDNA ファージライブラリーを作成した。得られたファージ(2,200,000 plaque forming units)を大腸菌 XL1-Blue MRF' (Stratagene 社製)に感染させた後、NZY 培地アガープレート 130 枚にまき、37°Cで 8 時間培養した。得られた大腸菌plaquesよりファージを Hybond N<sup>+</sup>ナイロンメンブレン(アマシャム社)に写し取った。このナイロンメンブレンを 1.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.5 N 水酸化ナトリウム溶液、1.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.5 M トリス緩衝液(pH 7.0)、及び 2 x SSC 液に順次浸した後、風乾させた。

得られたナイロンメンブレンをハイブリダイゼーション緩衝液(5x SSPE, 5x Denhardts 液 0.1% SDS, 0.1 mg/ml サケ精子 DNA)中にて 60°Cに 24 時間保温し、次いで、ハイブリダイゼーションプローブ( $2.8 \times 10^6$  cpm/ml)を含むハイブリダイゼーション緩衝液(同上)中にて、60°Cに 18 時間保温した。ハイブリダイゼーションプローブはプラスミド pGR2PL6 の

EcoRI/BglII 消化断片(配列番号: 4 5)を鋳型として、下記のプライマー pGAL1-1F, pGAL88-1R により増幅される DNA 断片(356 塩基対)を用いた。増幅反応の反応液組成は ExTaq(宝酒造株式会社)を 0.5  $\mu$  l、添付の 10x PCR buffer(500 mM KCl-25 mM MgCl<sub>2</sub>-100 mM Tris・HCl, pH 8.3)を 10  $\mu$  l、2.5 mM dNTP mixture を 8  $\mu$  l、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (6000 Ci/mmol)を 25  $\mu$  l、  
5 プライマー pGAL9-3F および pGAL34-8R (それぞれ 10  $\mu$  M) を各 1  $\mu$  l、および鋳型 cDNA を 1  $\mu$  l、蒸留水を 54  $\mu$  lを混合して作製し、反応条件は 94°C・30 秒の初期変性後、94°C・20 秒-60°C・30 秒-72°C・30 秒のサイクル反応を 32 回、および 72°C・4 分の最終伸長反応とした  
。

pGAL1-1F : 5'- ATGGCTCTGACTGTCCCTCTGATCGTTCT -3' (配列番号: 4 6)

10 pGAL88-1R: 5'- TGAAACCTCGTAGTCCTGGTCGGATTG -3' (配列番号: 4 7)

ハイブリダイゼーションの終了したナイロンメンブレンは 0.1% SDS を含む 2x SSC 緩衝液を用いて 50°C にて洗浄した後、X 線フィルム (Kodak 社、BioMax MS) を用いて増感スクリーンの存在下でオートラジオグラフィーに処した(曝露条件:-70°C、3 日間)。オートラジオグラフィーの結果から明らかになった陽性plaques を抜き取り、クロロフォルム 0.1 ml を<sup>15</sup> 含む SM 緩衝液(100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.01% gelatin, 50 mM Tris・HCl, pH 7.5) 5 ml 中にファージを抽出した。

得られたファージを再度大腸菌 XL1-Blue MRF' に感染させ NZY 培地アガーブレートにまき、  
37°C で 8 時間培養した。得られた大腸菌plaques よりファージをナイロンメンブレン (アマシャム社、Hybond N<sup>+</sup>) に写し取り、上記と同様の方法によりハイブリダイゼーションを行<sup>20</sup>った。オートラジオグラフィーにより、陽性の单一クローニングを選択し、これをキャピラリーで抜き取った。同様の一連の操作をもう一度繰り返し実施し、完全に单一なファージクローニングを取得した。

次に、クローニングされたファージからプラスミドを以下の方法で単離した。

ファージ液 (1  $\mu$  l) を大腸菌 XPORT (50  $\mu$  l)、ヘルペーファージ (10  $\mu$  l)、大腸菌 XL0LR (5 ml) と混合し、NZY アガーブレートにまき、37°C で 8 時間培養した。大腸菌 XPORT プラ<sup>25</sup>ク中に生じた大腸菌 XL0LR の小コロニーをつま楊枝でピックアップし、アンピシリンとテト

ラサイクリンを含むLB培地アガープレートにて37°C、一晩培養した。単一コロニーより大腸菌 XL0LR をピックアップし、LB培地中にて液体培養した。培養終了後、大腸菌 XL0LR を集菌し、プラスミド精製キット（キアゲン社、QIAgen 8Well Ultra）を用いてプラスミドを精製した。

5 得られたプラスミドを Dye terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems、パーキンエルマー社) を用いたシークエンシング反応に処し、次いでシークエンシング反応物を DNA sequencer Prism 377 (Applied Biosystems、パーキンエルマー社) を用いて解析した。その結果、ラット型リガンド全長ペプチド（1-60）をコードする 974 bp の DNA 断片（配列番号：39）を有する pGR2RL4 を得ることができた。該プラスミドによりトランス  
10 フォームさせた大腸菌 TOP10 を TOP10/pGR2RL4 と命名した。

#### 実施例 19 ヒト型リガンドペプチド（1-60）のクローニング

ヒト脳 poly(A)<sup>+</sup> RNA(CLONTECH 社)から、ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社)を用いて、ヒト脳 cDNA ライブライリーを作成した。得られた cDNA を鋳型としてプライマー F/R120  
15 と R/R120 を用いて PCR を実施した。

F/R120: 5'-AGGCTGGACCCTCAATAGTGCTGGTTAC-3' (配列番号：48)

R/R120: 5'-CCATCTATGGCCTTCCACAGGTCTAGGA-3' (配列番号：49)

PCR 反応液組成は Taq(宝酒造株式会社)を 0.5 μl、添付の 10x PCR buffer (500 mM KCl-25 mM MgCl<sub>2</sub>-100 mM Tris・HCl, pH 8.3)を 5 μl、2.5 mM dNTP mixture を 4 μl、25 mM MgCl<sub>2</sub>  
20 を 3 μl、プライマーF/R120 および R/R120 (それぞれ 100 μM) を各 0.25 ml、および鋳型 cDNA を 1 μl、蒸留水を 36 μl を混合して作製し、反応条件は 94°C・30 秒の初期変性後、94°C・30 秒-60°C・30 秒-72°C・60 秒のサイクル反応を 35 回、および 72°C・10 分の最終伸長反応とした。得られた DNA 断片を TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen 社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされた DNA 配列を実施例  
25 5 に記載された方法により解読し、配列番号：50 の配列を得た。

AGGCTGGACC CTCATAAGTG CTGGTTACCT TCTGGGTCCC GTCCTCCACC TTCCCCAAAT 60

GGGTGACCAA GACGGAAAGA GGGAGACAGC CCTTGAGATC CTAGACCTGT GGAAGGCCAT 120

AGATGG 126

(配列番号：50)

得られた配列よりプライマー 1F/H120 (配列番号：51)、1R/H120 (配列番号：52) を

5 作成し、以下に記した 5'RACE 及び 3'RACE 実験に用いた。

1F/H120: 5'-CAAATGGGTGACCAAGACGGAAAGAGGG-3' (配列番号：51)

1R/H120: 5'-GGTCTAGGATCTCAAGGGCTGTCTCCCT-3' (配列番号：52)

5'RACE 及び 3'RACE の PCR 反応液は Taq(宝酒造株式会社)を 0.5 μl、添付の 10x PCR buffer (500 mM KCl-25 mM MgCl<sub>2</sub>-100 mM Tris・HCl, pH 8.3)を 5 μl、2.5 mM dNTP mixture 10 を 4 μl、25 mM MgCl<sub>2</sub> を 3 μl、10 μM プライマーF/R120 (3'RACE の場合)あるいは 10 μM プライマーR/R120 (5'RACE の場合)を 1 ml、10 μM プライマーAP1 (プライマーAP1 は CLONTECH 社の Marathon-Ready cDNA Kit に添付のもの) を 1 μl、鑄型 cDNA (CLONTECH 社、Marathon-Ready cDNA Kit, Human Hypothalamus) を 5 μl、及び蒸留水を 31 μl を混合して作製した。反応条件は 94°C・60 秒の初期変性後、94°C・30 秒-72°C・120 秒のサイクル反応を 5 回、94°C・30 秒-70°C・120 秒のサイクル反応を 5 回、94°C・30 秒-68°C・120 秒のサイクル反応を 25 回および 68°C・10 分の最終伸長反応とした。

続いて、該 PCR 反応の反応液を鑄型として nested PCR を実施した。反応液は Taq(宝酒造株式会社)を 0.5 μl、添付の 10x PCR buffer (500 mM KCl-25 mM MgCl<sub>2</sub>-100 mM Tris・HCl, pH 8.3)を 5 μl、2.5 mM dNTP mixture を 4 μl、25 mM MgCl<sub>2</sub> を 3 μl、10 μM プライマー1F/H120 (3'RACE の場合)あるいは 10 μM プライマー1R/H120 (5'RACE の場合)を 1 μl、10 μM プライマーAP2 (プライマーAP2 は CLONTECH 社の Marathon-Ready cDNA Kit に添付のもの) を 1 μl、鑄型 DNA (該 PCR 反応液 50 倍希釈液) を 5 μl、及び蒸留水を 31 μl を混合して作製した。反応条件は 94°C・60 秒の初期変性後、94°C・30 秒-72°C・120 秒のサイクル反応を 5 回、94°C・30 秒-70°C・120 秒のサイクル反応を 5 回、94°C・30 秒-68°C・120 秒のサイクル反応を 25 回および 68°C・10 分の最終伸長反応とした。

得られた DNA 断片を TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen 社)を用いて添付のマニュアルに

記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされた DNA 配列を実施例 5 (ブタ cDNA cloning の項) に記載された方法により解読し、5' 端、3' 端の配列情報を得た。この配列情報よりプライマー 1F/H470、1R/H450 を作成した。

1F/H470: 5'-GAGGAGCCAGAGAGAGCTGCGGAGAG-3' (配列番号: 5 3)

5 1R/H470: 5'-GAGCTGGAGAAGAACAGGATAGGAACAGGG-3' (配列番号: 5 4)

該ヒト脳 cDNA ライブラリーを錆型としてプライマー F/H450 と R/H450 を用いて PCR を実施した。PCR 反応液は Pfu turbo DNA polymerase (Stratagene 社) を 0.5  $\mu$  l、添付の 10x PCR buffer (500 mM KCl-25 mM MgCl<sub>2</sub>-100 mM Tris・HCl, pH 8.3) を 5  $\mu$  l、2.5 mM dNTP mixture を 4  $\mu$  l、10  $\mu$  M プライマー F/H470 及び R/H470 を各 2.5 ml、錆型ヒト全脳 cDNA を 0.5  $\mu$  l、及び蒸留水を 35  $\mu$  l を混合して作製した。反応条件は 94°C・30 秒の初期変性後、94 °C・30 秒-70°C・5 分のサイクル反応を 35 回、および 72°C・10 分の最終伸長反応とした。得られた DNA 断片を pPCR-Script Amp SK(+) vector (Stratagene 社) を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされた DNA 配列を実施例 5 (ブタ cDNA cloning の項) に記載された方法により解読し、ヒト型リガンド全長ペプチド (1-60) をコードする 473 bp の DNA 断片 (配列番号: 4 0) を有する pGR2HL14 を得ることができた。該プラスミドによりトランスフォームさせた大腸菌 TOP10 を、それぞれ TOP10/pGR2HL14 と命名した。

#### 実施例 20 ブタ型リガンドペプチド (1-60) の構造遺伝子の調製 (図 10 参照)

20 本発明の (1-60) ペプチドの構造遺伝子は、実施例 5 で得られたプラスミド pGR2PL6 より、構造遺伝子の上流に隣接して Nde I 切断部位及びメチオニンを持つプライマー 1: 5'-AGCATATGGCTCCGGTCCACAGG-3' (配列番号: 5 5 キコーテック社製) と、下流に隣接して終始コドン及び BamH I 切断部位を持つプライマー 2: 5'-CTGGATCCTCAGGAGGCCAACTGAGAC-3' (配列番号: 5 6 グライナー・ジャパン社製) を用いて、PCR で増幅した。この遺伝子を 25 TOPO TA Cloning Kit (インヴィトロジェン社製) を用いて pCRII-TOPO ベクターに連結し、pCRII/GAL を作成した。このプラスミドを TOP10 One Shot コンピテントセルに形質転換し、

X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactose) を塗布した 50  $\mu$  g/mL のアンピシリンを含む LB 寒天培地 (1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、2%寒天) 上に播き、37°Cで 1 日培養し、テトラサイクリン耐性と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。この形質転換体を 50  $\mu$  g/mL のアンピシリンを含む LB 培地 (1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム) で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit (キアゲン社) を用いてプラスミドを回収した。またプライマー 3 : 5'-CAGCCCTCGGCATCCTGGACC-3' (配列番号 : 57 グライナー・ジャパン社製) およびプライマー 4 : 5'-GGTCCAGGATGCCGAGGGCTG-3' (配列番号 : 58 グライナー・ジャパン社製) を用いて、部位特異的変異導入 (Quick Change, STRATAGENE 社製) により本発明のブタ型リガンドペプチド (1-60) 構造遺伝子中の BamH I と隣接して存在する Ava I 認識部位を欠損させた pCRII/GALdesBam を作成した。プラスミドの本発明のブタ型リガンドペプチド (1-60) 構造遺伝子部分の塩基配列は、アプライドバイオシステムズ社モデル 377DNA シークエンサーを用いて確認を行った。塩基配列を確認した pCRII/GALdesBam 2  $\mu$  g を Nde I で切断し、T4 DNA ポリメラーゼ (DNA Blunting Kit、宝酒造社製) で末端を平滑化した。次に EcoR V で切断後、3%アガロースゲル電気泳動を行い、約 200bp の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて抽出し、25  $\mu$  L の TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH8.0) 、1mM EDTA) に溶解した。

#### 実施例 21 ブタ型リガンドペプチド (1-60) 発現プラスミドの調製

##### a) 融合蛋白質発現用ベクターの調製 (図 11 参照)

1998年6月15日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に FERM BP-6388 として寄託されており、1997年6月25日から財団法人発酵研究所 (IFO) に IFO 16100 として寄託されている形質転換体 *Escherichia coli* MM294 (DE3) /pTB960-11 に保持されているプラスミド pTB960-11 1  $\mu$  g を Xba I と Ava I で切断後 1%アガロースゲル電気泳動を行い、約 4.4 kbp の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社) を用いて抽出し、50  $\mu$  L の TE 緩衝液に溶解し

た。hFGF ムテイン CS23 構造遺伝子の欠損部分と、その上流に隣接して Nde I 切断部位及び開始コドンが挿入されるようにデザインされた合成 DNA ( 5'-CTAGACATATGCCAGCATTGC-3' (配列番号: 59) および 5'-TCGGGCAATGCTGGCATATGT-3' (配列番号: 60) 共にグライナー・ジャパン社製) の各 1  $\mu$ g を 100  $\mu$ L のリン酸化反応液 [50mM Tris-HCl (pH7.6)、10mM MgCl<sub>2</sub>、5mM ジチオスレイトール、0.1mM スペルミジン、0.1mM EDTA、1mM ATP、10 unit T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (日本ジーン社製) ] 中で 37°C・1 時間反応させ、5'末端のリン酸化を行った。反応終了後、フェノール・クロロフォルム抽出、エタノール沈殿を行った。沈殿を TE 緩衝液 50  $\mu$ L に溶解し、この溶液を 80°C で 10 分間保持した後、室温で徐冷しアニーリングした。Xba I-Ava I DNA 断片とアニーリング液は、Takara DNA Ligation Kit Ver2 (宝酒造) を用いてライゲーションが行われた。すなわち、Xba I-Ava I DNA 断片 1  $\mu$ L とアニーリング液 1  $\mu$ L に蒸留水 3  $\mu$ L とライゲーション I 液 5  $\mu$ L を加え、16°C・30 分間反応させた。このライゲーション液 10  $\mu$ L を用いて大腸菌 JM109 コンピテントセル (東洋紡製) を形質転換し、10  $\mu$ g/mL のテトラサイクリンを含む LB 寒天培地上に播き、生じたテトラサイクリン耐性のコロニーを選択した。この形質転換体を LB 培地で一晩培養し、QIAprep 8 Miniprep Kit (キアゲン社) を用いてプラスミドを調製した。このプラスミドを Nde I で切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、Nde I の切断部位が新たに生じていることを確認し、プラスミド pTBNde とした。

次に、プラスミド pTBNde 1  $\mu$ g を Pst I で切断し、T4 DNA ポリメラーゼ (DNA Blunting Kit、宝酒造) で末端を平滑化した後、フェノール・クロロフォルム抽出、エタノール沈殿を行った。得られた沈殿を TE 緩衝液 10  $\mu$ L に溶解し、Nde I で切断後、3%アガロースゲル電気泳動を行い、約 470bp の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて抽出し、25  $\mu$ L の TE 緩衝液に溶解した。1998年11月24日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6582 として、1998年10月27日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号 IFO 16212 として寄託されている形質転換体エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) MM294 (DE3) / pT CII Id 23-MP IF 1 に保持されているプラスミド pT CII 1  $\mu$ g を Bsm I と Pvu II

で切断後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、約3.7kbpのDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kitを用いて抽出し、25μLのTE緩衝液に溶解した。このDNA断片をDNA Blunting Kitを用いT4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化後ライゲーションを行った。ライゲーション終了液をフェノール・クロロフォルム抽出した後、エタノール沈殿を行いTE緩衝液10μLに溶解した。この溶液をBamH Iで切断し、T4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化した後、更にNde Iで切断し、1%アガロースゲル電気泳動を行い、約3.7kbpのDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kitを用いて抽出し、50μLのTE緩衝液に溶解した。上記約470bpのNde I-Blunt DNA断片4μLと約3.7kbpのNde I-Blunt DNA断片1μLにライゲーションI液5μLを加え、16°C・30分間反応させた。ライゲーション液10μLを用いて大腸菌JM109コンピテントセル(東洋紡社製)を形質転換し、10μg/mLのテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、生じたテトラサイクリン耐性のコロニーを選択した。この形質転換体をLB培地で一晩培養後、QIAprep8 Miniprep Kitを用いてプラスミドを調製し、融合蛋白質発現用ベクターpTFCとした。

b) ブタ型リガンドペプチド(1-60)発現株の構築(図12参照)

融合蛋白質発現用ベクターpTFC1μgをBamH Iで切断し、T4 DNAポリメラーゼ(DNA Blunting Kit、宝酒造社製)で末端を平滑化した後、1%アガロースゲル電気泳動を行い、約4.2kbpのDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit(キアゲン社製)を用いて抽出し、50μLのTE緩衝液に溶解した。この断片と実施例20で調製した本発明のペプチドの構造遺伝子をTakara DNA Ligation Kit Ver2(宝酒造社製)を用いてライゲーションを行った。すなわちpTFCのBamH I切断平滑化溶液1μLと本発明のペプチドの構造遺伝子溶液4μLを混合し、更にライゲーションI液5μLを加え、16°C・30分間反応させた。ライゲーション液10μLを用いて大腸菌JM109コンピテントセル(東洋紡社製)を形質転換し、10μg/mLのテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、37°Cで1日培養し、生じたテトラサイクリン耐性のコロニーを選択した。

この形質転換体をLB培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit(キアゲン社製)を用いてプラスミドを回収し、本発明のペプチド発現プラスミドpTFCGALとした。このプラスミ

ドの融合蛋白質の構造遺伝子部分の塩基配列は、アプライドバイオシステムズ社モデル 377DNA シークエンサーを用いて確認を行った。この発現プラスミド pTFCGAL を大腸菌 MM294 (DE3) に形質転換し、 $10 \mu \text{g/mL}$  のテトラサイクリンを含む LB 寒天培地上に播き、37 °Cで 1 日培養し、テトラサイクリン耐性の形質転換株を選択し、本発明のペプチド発現株 5 MM294 (DE3) / pTFCGAL を取得した。この形質転換大腸菌 MM294 (DE3) / pTFCGAL は受託番号 FERM BP-6678 で 1999 年 3 月 10 日付で通産省工業技術院微生物工業研究所に寄託された。また 1999 年 2 月 26 日付受託番号 IFO 16260 として財団法人発酵研究所 (IFO) に寄託された。

### 実施例 2 2 ブタ型リガンドペプチド (1-60) 発現株の培養

10 実施例 2 1 で得た本発明のペプチド発現株 MM294 (DE3) / pTFCGAL を  $5\text{mg/L}$  のテトラサイクリンを含む LB 培地 1L で  $37^\circ\text{C} \cdot 16$  時間振とう培養した。得られた培養液を 20L の主発酵用培地 (1.68% リン酸一水素ナトリウム、0.3% リン酸二水素カリウム、0.1% 塩化アンモニウム、0.05% 塩化ナトリウム、0.05% 硫酸マグネシウム、0.0005% 塩酸チアミン、1.5% グルコース、1.0% カザミノ酸、1.0% イーストエキス) を仕込んだ 50L 容発酵槽に移植して、 $37^\circ\text{C}$ 、通気量 20L/min 15 、攪拌回転数 200rpm で通気攪拌培養を行った。培養液の濁度が約 1200 クレット単位になった時点で、最終濃度  $23.8\text{mg/L}$  となるようにイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加した。IPTG 添加後 30 分及び 150 分後に 0.75% グルコースを添加し培養開始 10 時間後まで培養を行った。培養液を 5000rpm · 30min の遠心分離を行い、菌体約 830g を得た。

20

### 実施例 2 3 ブタ型リガンドペプチド (1-60) の精製

実施例 2 2 で得た菌体 200g に 600mL の 150mM 塩化ナトリウム、0.1mM p-アミジノフェニルメタンスルホニルフルオリド塩酸塩 (APMSF) 、0.1mM EDTA を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を加え懸濁し、超音波処理 (BRANSON SONIFIER MODEL450) をした後、遠心分離 (10000rpm · 10 分間) を行い、上清を廃棄し封入体を得た。この封入体を 60mL の蒸留水に懸濁し、140mL のぎ酸を加え溶解後、融合蛋白質の CS23 と本発明のブタ型リガンドペプチド (1-60)

を連結しているメチオニンのC末端側のペプチド結合での切断反応を行うため、2g の臭化シアンを加え室温で 24hr 処理を行った。反応終了後、この溶液を蒸留水に一晩透析し、遠心分離 (10000rpm・10 分間) した。上清を 50mM Tris-HCl (pH7.5) に再度一晩透析後、塩酸で pH6.0 に調整し、遠心分離 (10000rpm・10 分間) し、遠心上清液約 400mL を得た。この遠心上清液を 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) で平衡化した CM-TOYOPEARL 650M (3.0cmID × 10cmL、東ソー社製) に 10mL/min で吸着させ、平衡化に用いた緩衝液でよく洗浄した後、0-100%B (B = 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液+1M 塩化ナトリウム、pH6.0) の段階勾配により溶出を行い、本発明のブタ型リガンドペプチド (1-60) を含む画分を得た。この画分の 1/3 量を 0.1% トリフルオロ酢酸で平衡化した C4P-50 (2.15cmID × 30cmL、昭和電工社製) に 5mL/min で吸着させた後、33-43%B (B = 80% アセトニトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸) の段階勾配により溶出を行った。同様の操作を残り 2/3 量についても行い、本発明のブタ型リガンドペプチド (1-60) を含む画分を回収し、凍結乾燥を行い、本発明のブタ型リガンドペプチド (1-60) 精製品 67mg を得た。

a) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

本発明のブタ型リガンドペプチド (1-60) 精製品を 2% SDS、10% グリセロール、5% 2-メルカプトエタノール、0.001% ブロムフェノールブルーを含む 0.0625 Tris-HCl (pH6.8) [Laemmli, U. K : Nature, 227, 680(1979)] で溶解し、3 分間煮沸後、マルチゲル 15/25 (第一化学薬品社製) で電気泳動を行った。泳動後のゲルをラピッド CBB KANTO (関東化学) で染色したところ、単一バンドであった (図 13 参照)。

b) アミノ酸組成分析

本発明のブタ型リガンドペプチド (1-60) 精製品を 1% フェノールを含む 6N 塩酸で 110°C、24 及び 48 時間気相加水分解を行い、アミノ酸分析計 (日立 L-8500A Amino Acid Analyzer) を用いてアミノ酸組成を決定した。その結果、表 5 に示されるように cDNA 塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した。

表5. アミノ酸組成分析

アミノ酸	1モル当たりの 残基数	塩基配列 から予想される値
A s p	3. 0	3
T h r	2. 0	2
S e r	3. 7	4
G l u	3. 0	3
P r o	5. 8	6
G l y	1 0 . 6	1 1
A l a	5. 8	6
V a l	1. 9	2
I l e	1. 9	2
L e u	9. 0	9
T y r	1. 9	2
L y s	2. 9	3
H i s	1. 9	2
T r p	1. 3	2
A r g	2. 7	3

Thr と Ser は 0hr に外挿した。

Val と Ile は 48hr の値を用いた。

## c) N 末端アミノ酸配列分析

N 末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステム モデル 477A）を用いて決定した。この結果、表 6 に示されるように cDNA 塩基配列から予想される  
5 アミノ酸組成と一致した。

表 6. N 末端アミノ酸配列

10	塩基 No.	検出された PTH <sup>1)</sup> -アミノ酸 (pmol)	塩基配列から予想されるアミノ酸
1	1	A l a (823)	A l a
2	2	P r o (676)	P r o
3	3	V a l (719)	V a l
4	4	H i s (355)	H i s
5	5	A r g (418)	A r g
15	6	G l y (548)	G l y
7	7	A r g (339)	A r g
8	8	G l y (470)	G l y
9	9	G l y (575)	G l y
10	10	T r p (189)	T r p

1nmol を用いて分析を行った。

1) フェニールチオヒダントイン

20

## d) C 末端アミノ酸分析

本発明のブタ型リガンドペプチド（1-60）精製品を無水ヒドラジンで 100°C、3.5 時間  
25 間気相加水分解を行い、アミノ酸分析計（日立 L-8500A Amino Acid Analyzer）を用いて C 末端を決定した。この結果、表 7 に示されるように cDNA 塩基配列から予想されるアミノ酸

と一致した。

表7. C末端アミノ酸

5

C末端アミノ酸	回収率 (%)
S e r	61.5

気相ヒソラジン分解法 (100°C、3.5 時間)

#### 実施例24 摂食試験

ペントバルビタール麻酔下の Wistar 雄性ラット (8 W) の第三脳室 (AP:-7.1, L:0.0, H:2.0 mm) にガイドカニューレを挿入した。術後、1 週間回復させてから摂食実験を行った。明暗周期 12 時間(明:8 時から 20 時)で飼育し、摂食実験は 16 時から開始した。ラットに無麻酔、無拘束下でマイクロインジェクションカニューレを取り付け、PBS に溶解させたブタ型ペプチド (1-60) (配列番号: 31) または PBS のみを  $2.5 \mu l/min$  で 4 分間投与した。投与終了から 1 分後にマイクロインジェクションカニューレを取り外し、自由に標準飼料を摂食させた。投与終了から 90 分内間に摂食した餌を計量し、摂食量とした(図14)。

#### 産業上の利用可能性

本発明のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩は、ガラニン・レセプターを活性化する能力を有する。従って、ガラニン・レセプターが多く分布している視床下部、下垂体、子宮、腎臓、前立腺または骨格筋における、副作用の少ない機能調節剤などの医薬の開発等に用いることができる。

本発明のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることによって、ガラニン・レセプターとの結合性を変化させる化合物のスクリーニングが可能になる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、かつ配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に結合する能力を有するペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
2. 配列番号：35で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、かつ配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質を活性化する能力を有する請求項1記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
3. 配列番号：36で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
4. ペプチドが、配列番号：11、12、15、16または43で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである請求項1または請求項3記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
5. ペプチドが、配列番号：11、12、15、16または43で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有し、分子量が5000～10000であるペプチドである請求項1または請求項3記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
6. ペプチドが配列番号：31、33または34で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドである請求項1または請求項3記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
7. 前駆体が配列番号：29で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドである請求項1または請求項3記載のペプチドの前駆体またはその

アミドもしくはそのエステルまたはその塩。

8. 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：30、37または38で表されるアミノ酸配列である請求項6記載のペプチドの前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

5 9. 請求項1または請求項3記載のペプチドをコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNA。

10. 配列番号：31、33または34で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドをコードする請求項9記載のDNA。

10 A. 11. 配列番号：32、39または40で表される塩基配列を有する請求項10記載のDN

12. 配列番号：29、30、37または38で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する請求項1または請求項3記載のペプチドの前駆体をコードする塩基配列を含有するDNAを含有するDNA。

13. 配列番号：27、28、41または42で表される塩基配列を含有するDNAを含有する請求項12記載のDNA。

14. 請求項9記載のDNAを含有する組換えベクター。

15. 請求項14記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

16. 請求項15記載の形質転換体を培養し、請求項1または請求項3記載のペプチドを生成せしめることを特徴とする請求項1または請求項3記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。

17. 請求項1または請求項3記載のペプチドまたはその前駆体に対する抗体。

18. 請求項17記載の抗体を含有してなる診断薬。

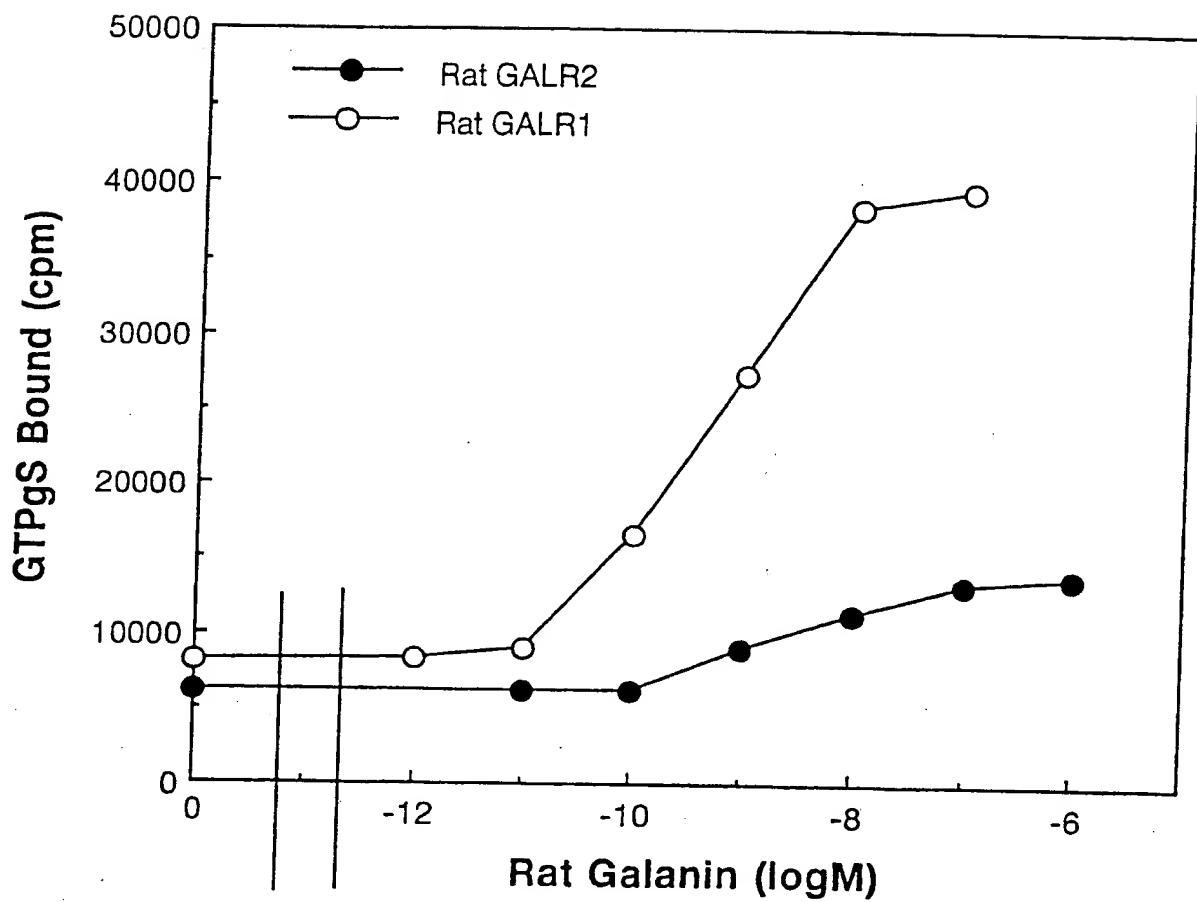
19. 請求項1または請求項3記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。

20. 記憶機能改善剤、食欲調節剤、子宮機能調節剤、腎臓機能調節剤、前立腺機能調節剤、精巣機能調節剤または骨格筋機能調節剤である請求項19記載の医薬。

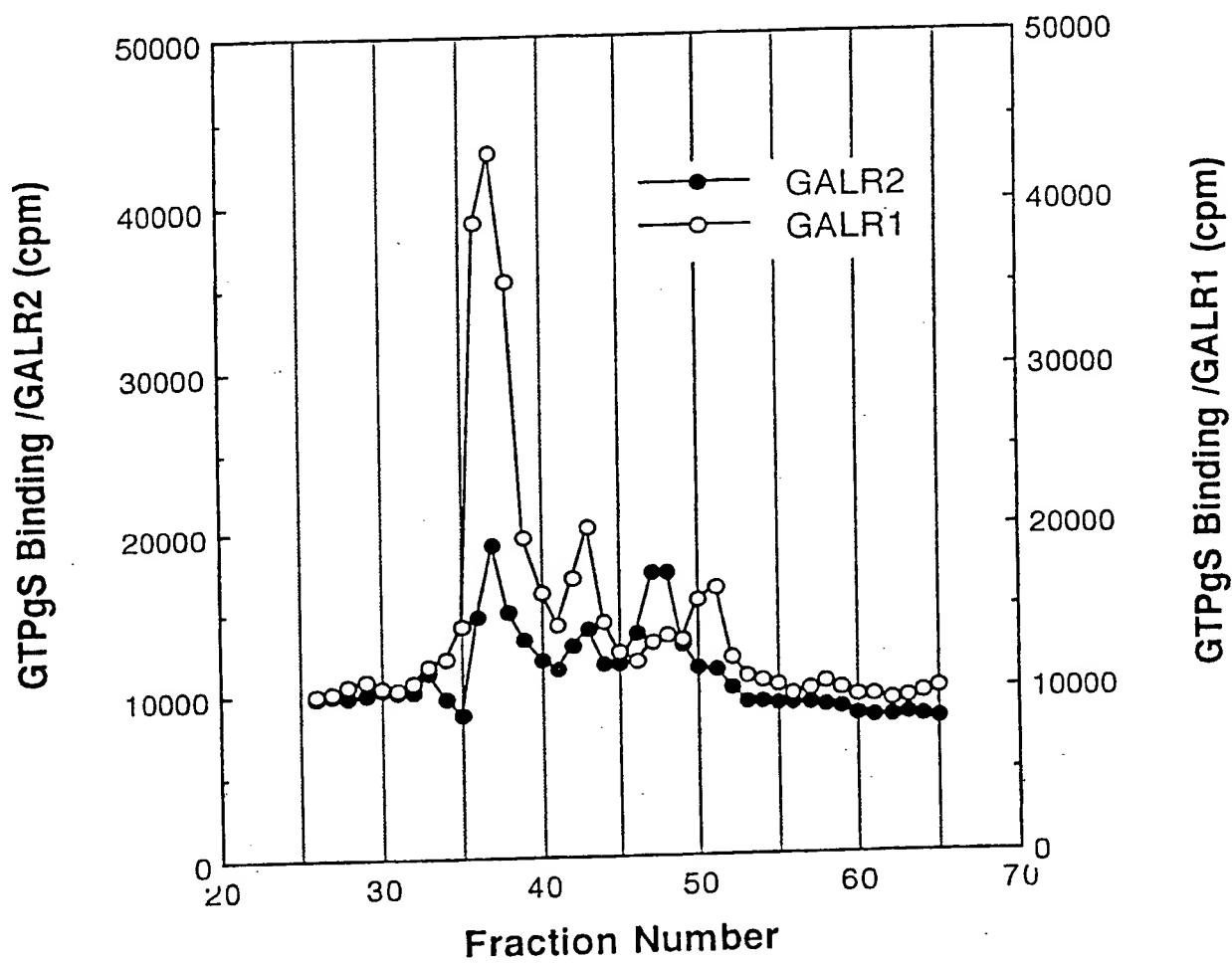
21. 請求項1または請求項3記載のペプチドもしくはその前駆体またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：1、2または3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

5 22. 請求項21記載のスクリーニング方法によって得られる化合物またはその塩。

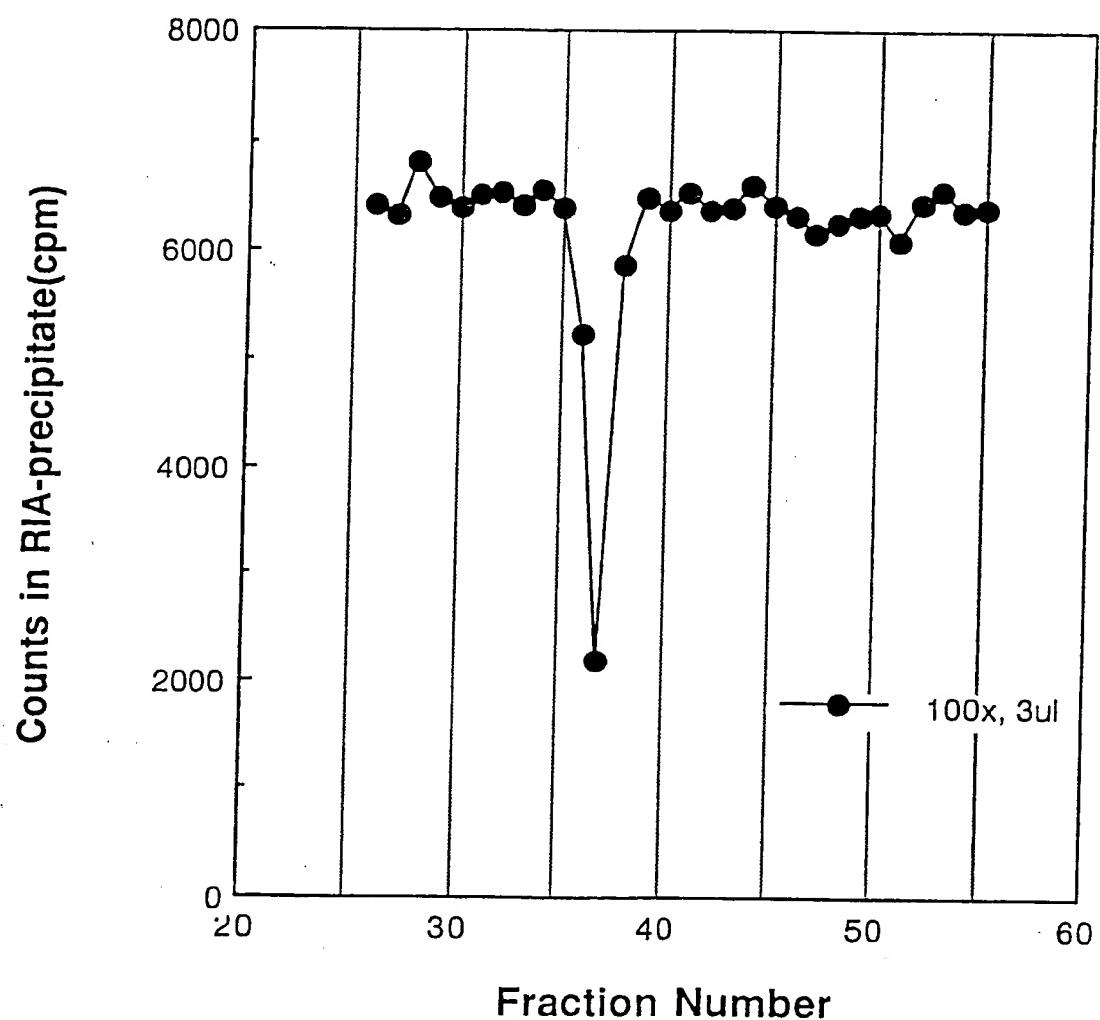
☒ 1



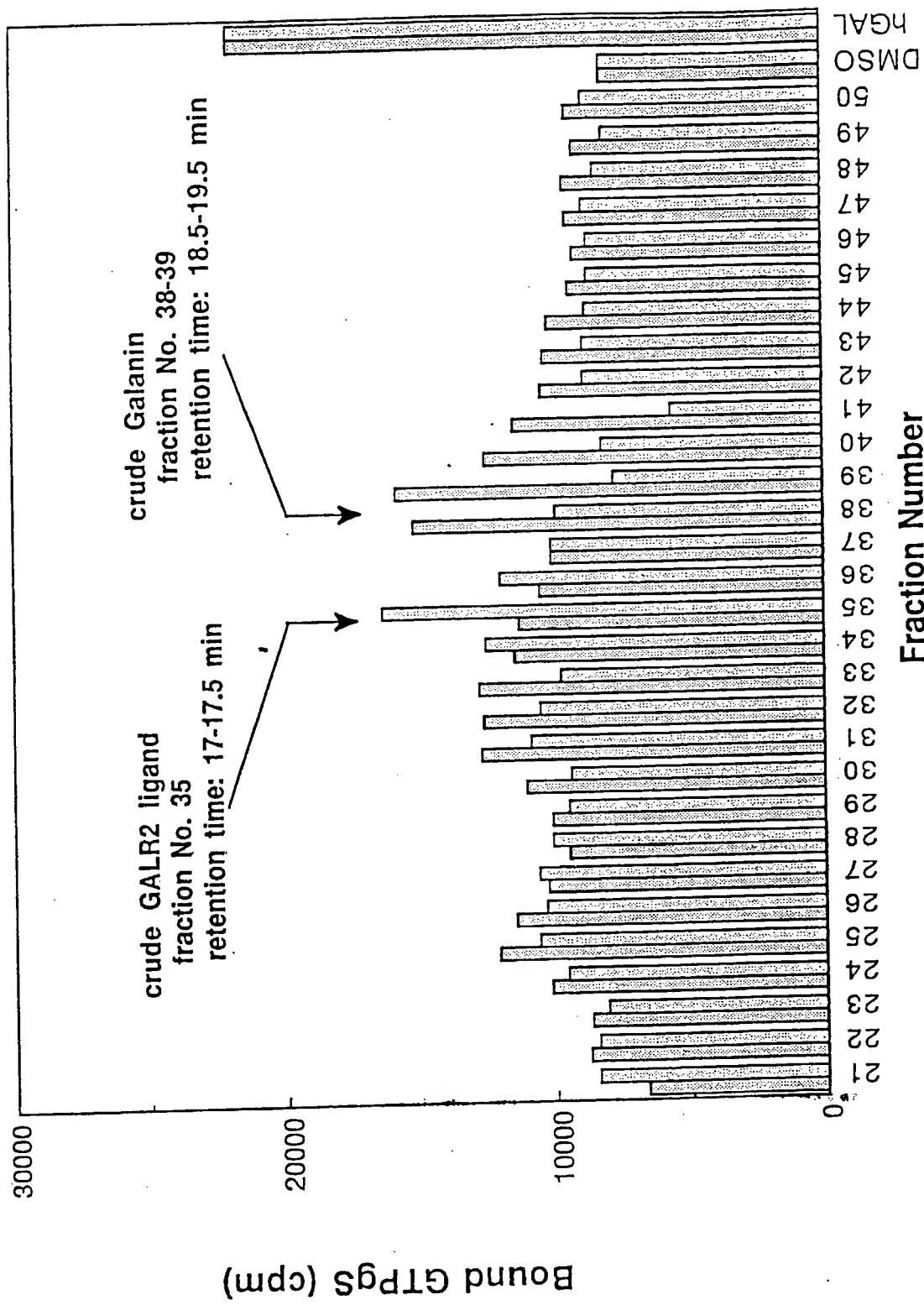
☒ 2



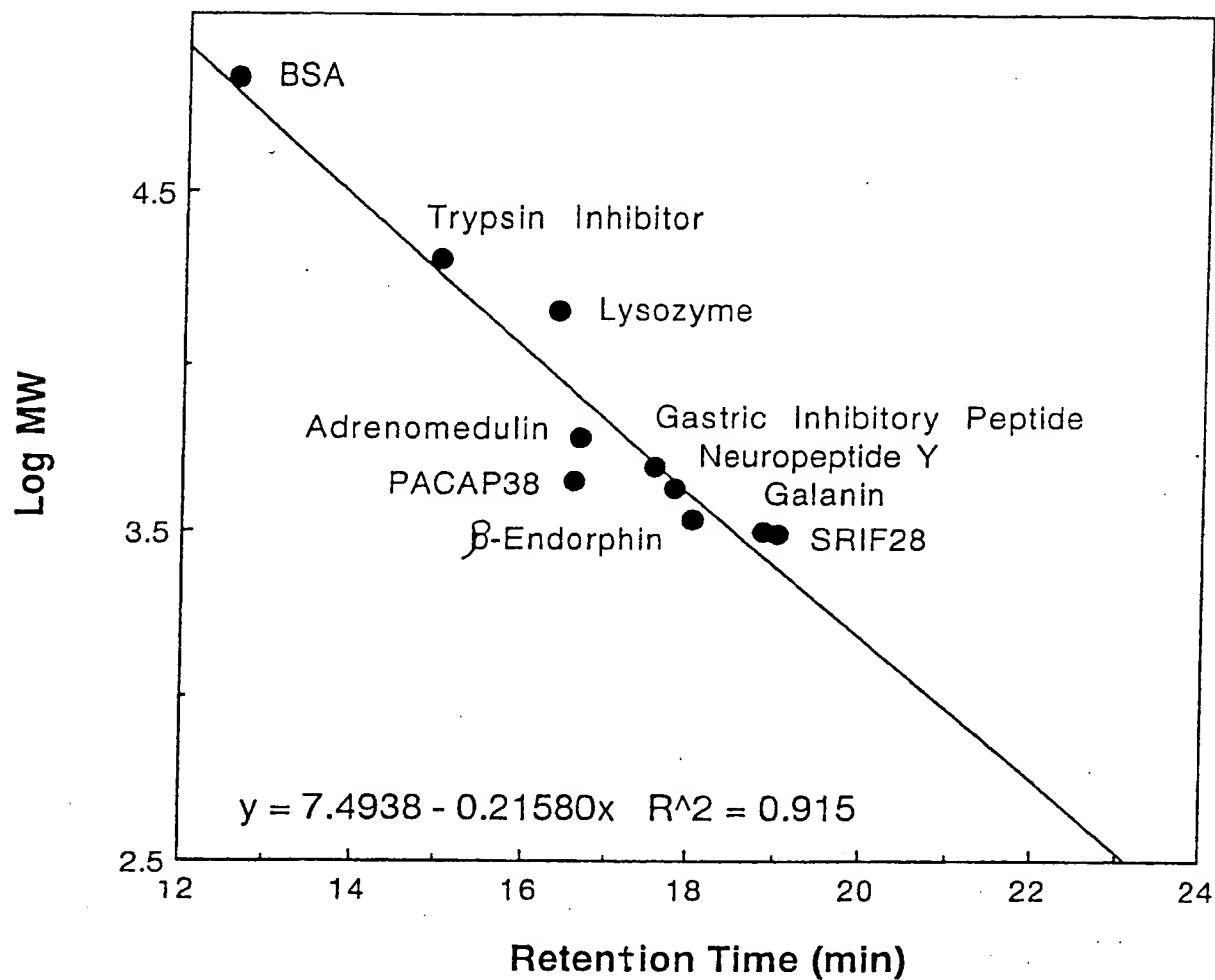
☒ 3



X 4



☒ 5



#### G2000SWXL Calibration

Peptides	MW	logMW	RT(min)
BSA	66,000	4.82	12.6
Trypsin inhibitor, soybean	20,100	4.303	14.982
Lysozyme, egg white	14,300	4.155	16.392
Adrenomedulin	6028.8	3.78	16.662
Gastric inhibitory peptide	4983.6	3.698	17.547
PACAP38	4534.3	3.657	16.6
Neuropeptide Y	4271.7	3.631	17.813
$\beta$ -Endorphin	3465	3.54	18.02
Galanin	3157.4	3.499	18.858
SRIF28	3146.5	3.498	19.003

☒ 6

1

M P R G C A L L L A S L L A S A L S A T L G L G S P V K E K R G W  
A P V H R G R G G W  
1 5 10

5 10 15 20 25 29  
T L N S A G Y L L G P H A I D N H R S F H D K Y G L A G K R E L E P  
T L N S Ä G Y L L G P V L H P P S X A E G G G K G K T A L G I L D L  
15 20 25 30 35 40 44

E D E A R P G G F D R L Q S E D K A I R T I M E F L A F L H L K E A  
-- X A I D G L P Y P Q S T X

G A L G R L P G L P S A A S S E D A G Q S

アミノ酸配列比較

上段にはブタガラニン前駆体のアミノ酸配列を、下段には本願ペプチドのアミノ酸配列を示した。

図 7

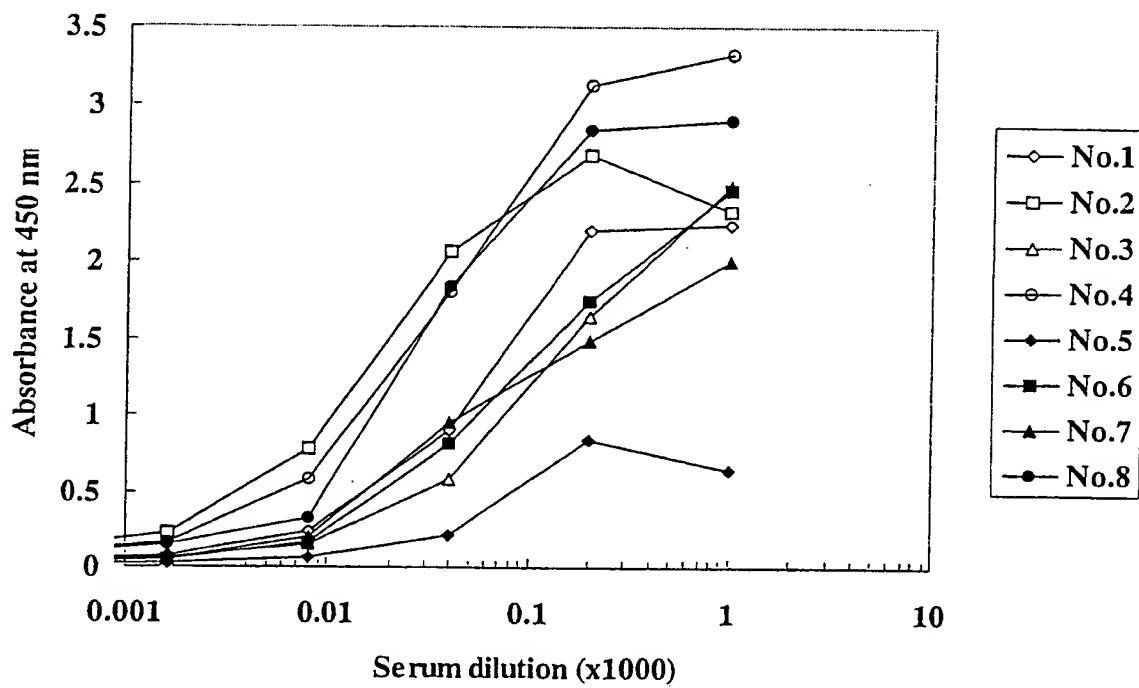
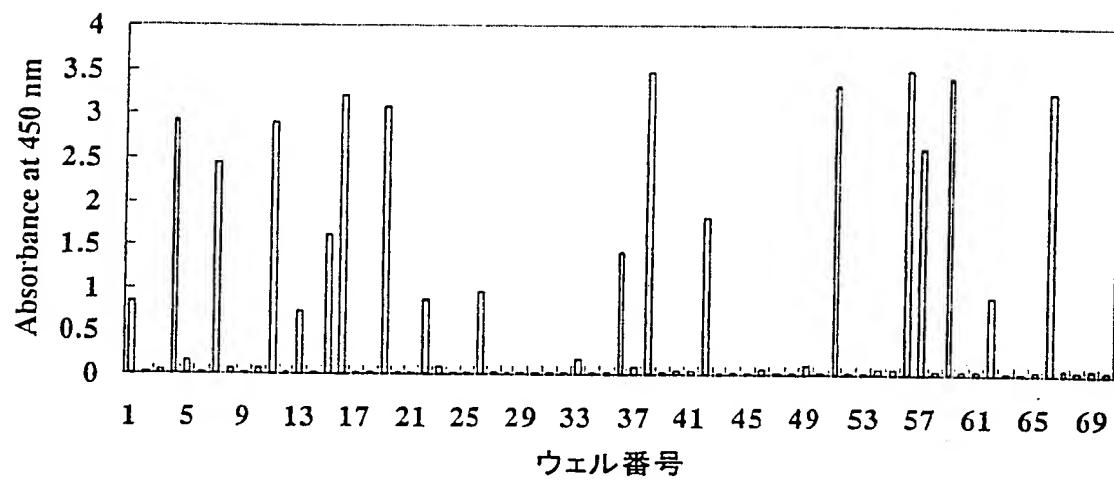
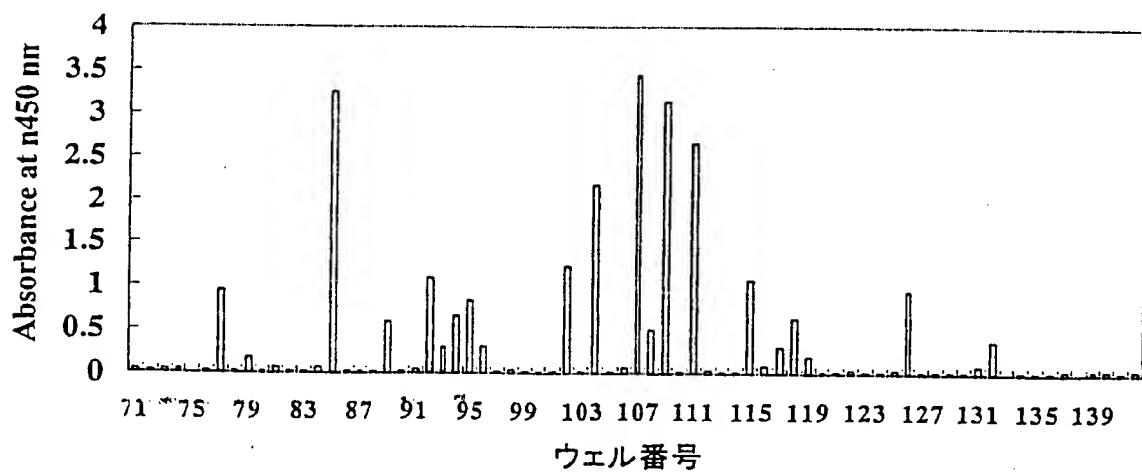


図 8

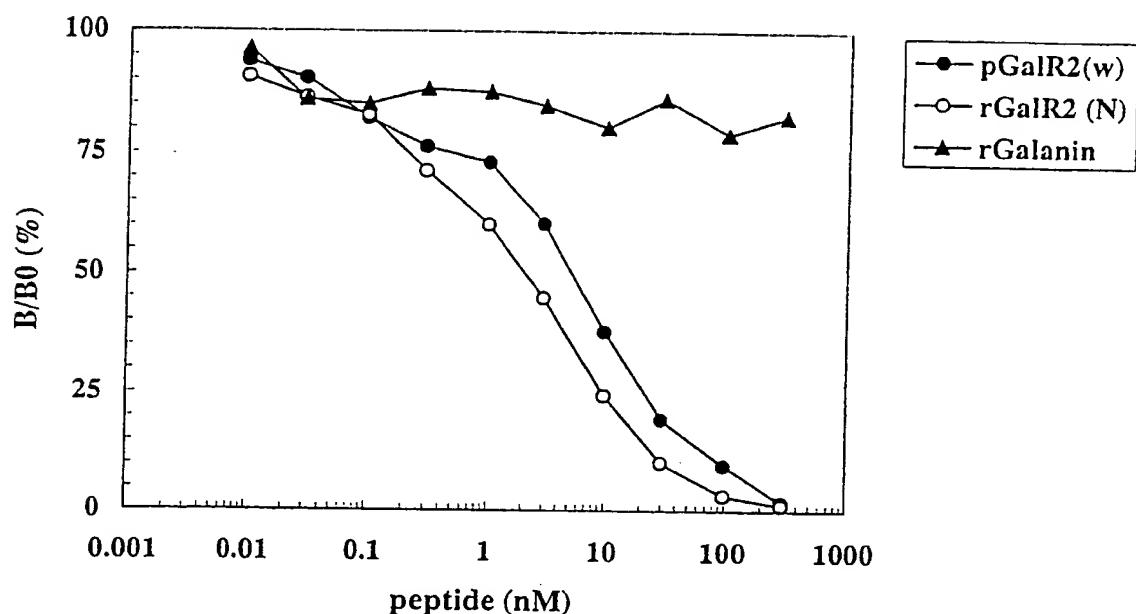
a



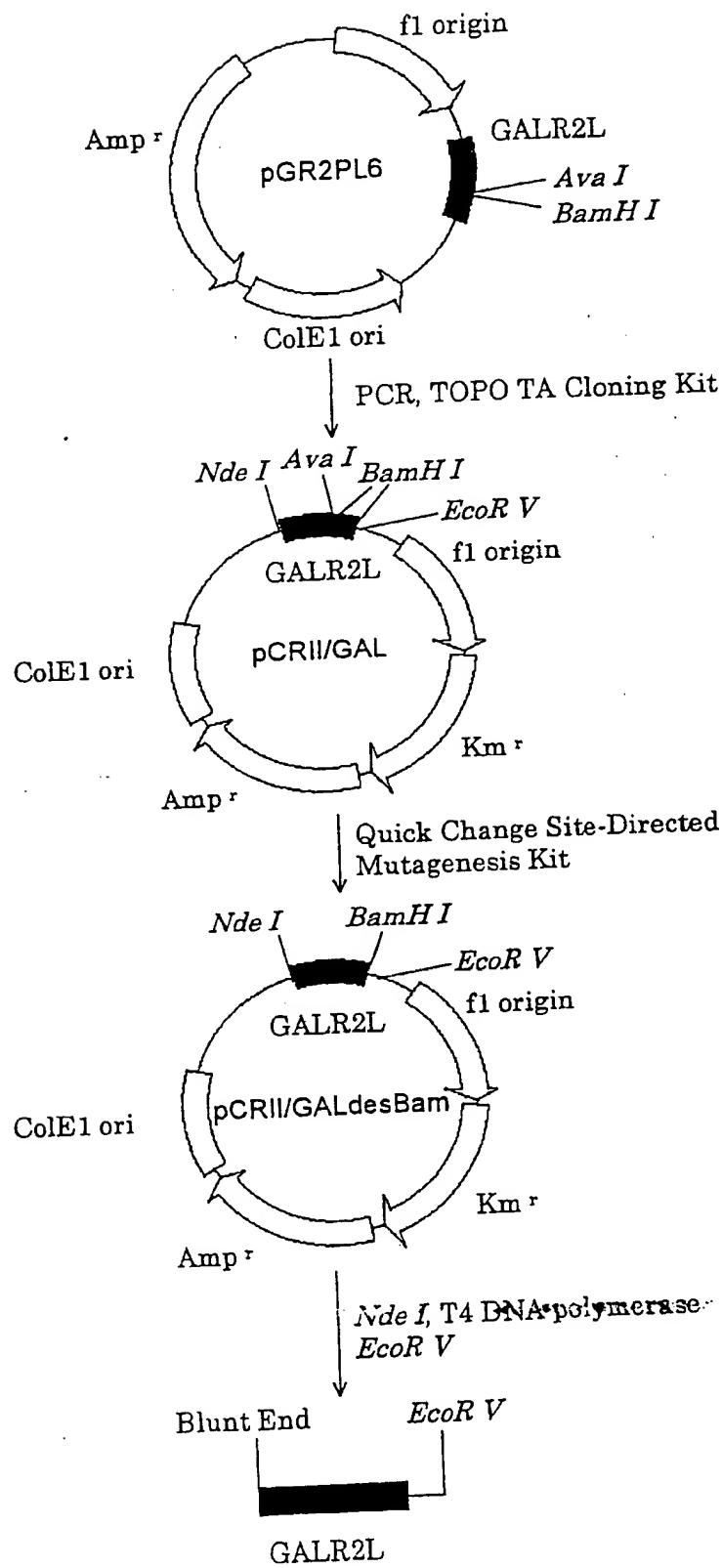
b



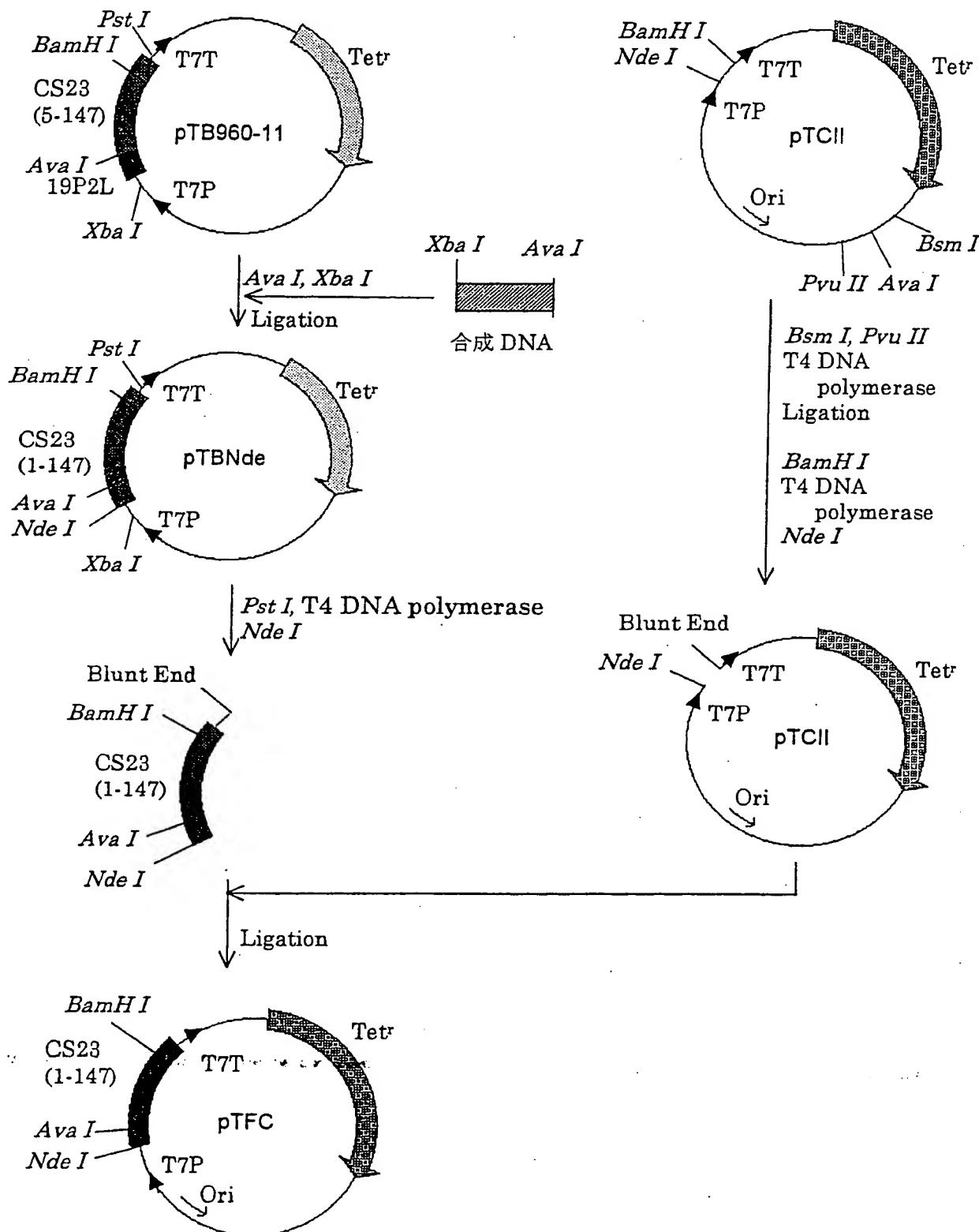
☒ 9



☒ 1 0



## 図 1 1



## 図 1-2

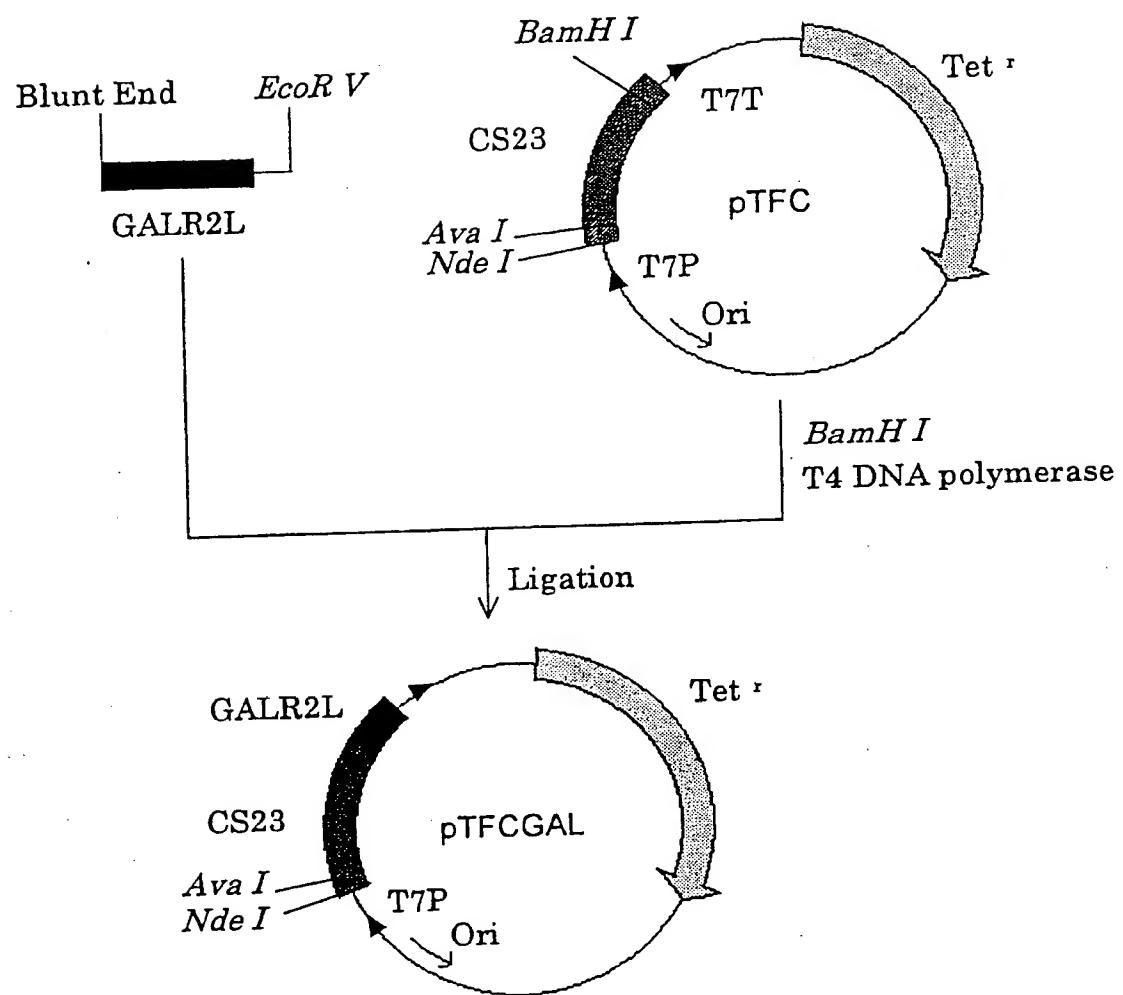


図 1 3

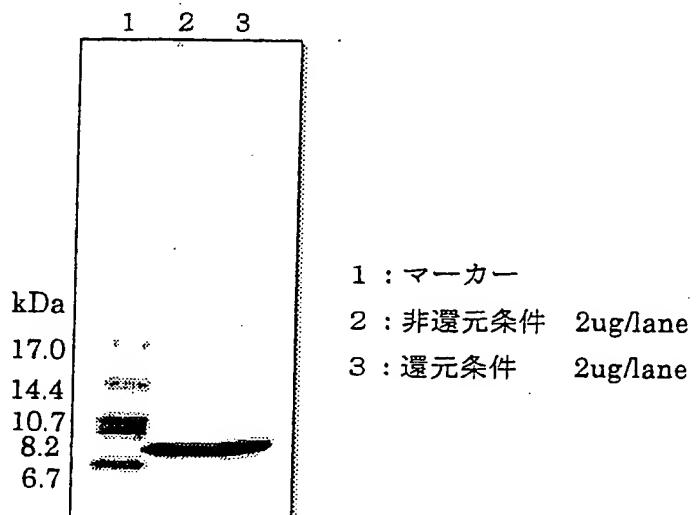
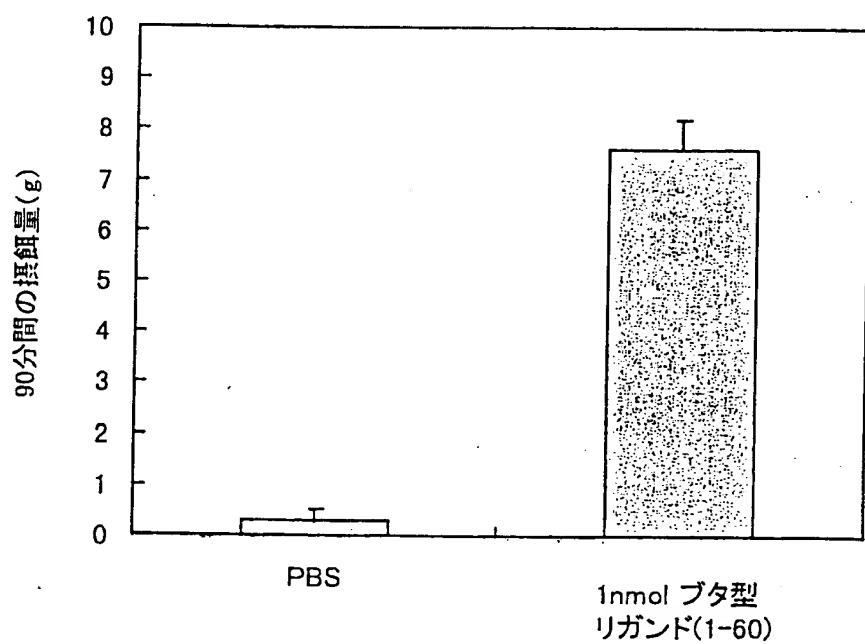


図 1 4



## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.  
<120> Novel Physiological Active Peptide and its Use  
<130> A98030  
<150> JP 10-078139  
<151> 1998-03-25  
<130> A98166  
<150> JP 10-266972  
<151> 1998-09-21  
<160> 54  
<210> 1  
<211> 346  
<212> PRT  
<213> Rat  
<400> 1

Met Glu Leu Ala Pro Val Asn Leu Ser Glu Gly Asn Gly Ser Asp Pro  
1 5 10 15  
Glu Pro Pro Ala Glu Pro Arg Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu Asn  
20 25 30  
Phe Ile Thr Leu Val Val Phe Gly Leu Ile Phe Ala Met Gly Val Leu  
35 40 45  
Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly Lys  
50 55 60  
Pro Arg Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala Asp  
65 70 75 80  
Leu Ala Tyr Leu Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr Ala

85                    90                    95

Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His Tyr  
100                    105                    110

Phe Phe Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ile Phe Thr Leu Ala Ala Met  
115                    120                    125

Ser Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Val His Ser Arg Arg Ser Ser Ser  
130                    135                    140

Leu Arg Val Ser Arg Asn Ala Leu Leu Gly Val Gly Phe Ile Trp Ala  
145                    150                    155                    160

Leu Ser Ile Ala Met Ala Ser Pro Val Ala Tyr Tyr Gln Arg Leu Phe  
165                    170                    175

His Arg Asp Ser Asn Gln Thr Phe Cys Trp Glu His Trp Pro Asn Gln  
180                    185                    190

Leu His Lys Lys Ala Tyr Val Val Cys Thr Phe Val Phe Gly Tyr Leu  
195                    200                    205

Leu Pro Leu Leu Ile Cys Phe Cys Tyr Ala Lys Val Leu Asn His  
210                    215                    220

Leu His Lys Lys Leu Lys Asn Met Ser Lys Lys Ser Glu Ala Ser Lys  
225                    230                    235                    240

Lys Lys Thr Ala Gln Thr Val Leu Val Val Val Val Phe Gly Ile  
245                    250                    255

Ser Trp Leu Pro His His Val Ile His Leu Trp Ala Glu Phe Gly Ala  
260                    265                    270

Phe Pro Leu Thr Pro Ala Ser Phe Phe Phe Arg Ile Thr Ala His Cys  
275                    280                    285

Leu Ala Tyr Ser Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Leu

290                    295                    300  
Ser Glu Asn Phe Arg Lys Ala Tyr Lys Gln Val Phe Lys Cys Arg Val  
305                    310                    315                    320  
Cys Asn Glu Ser Pro His Gly Asp Ala Lys Glu Lys Asn Arg Ile Asp  
325                    330                    335  
Thr Pro Pro Ser Thr Asn Cys Thr His Val  
340                    345  
<210> 2  
<211> 372  
<212> PRT  
<213> Rat  
<400> 2  
Met Asn Gly Ser Gly Ser Gln Gly Ala Glu Asn Thr Ser Gln Glu Gly  
1                    5                    10                    15  
Gly Ser Gly Gly Trp Gln Pro Glu Ala Val Leu Val Pro Leu Phe Phe  
20                    25                    30  
Ala Leu Ile Phe Leu Val Gly Thr Val Gly Asn Ala Leu Val Leu Ala  
35                    40                    45  
Val Leu Leu Arg Gly Gly Gln Ala Val Ser Thr Thr Asn Leu Phe Ile  
50                    55                    60  
Leu Asn Leu Gly Val Ala Asp Leu Cys Phe Ile Leu Cys Cys Val Pro  
65                    70                    75                    80  
Phe Gln Ala Thr Ile Tyr Thr Leu Asp Asp Trp Val Phe Gly Ser Leu  
85                    90                    95  
Leu Cys Lys Ala Val His Phe Leu Ile Phe Leu Thr Met His Ala Ser  
100                    105                    110

Ser Phe Thr Leu Ala Ala Val Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Arg  
115 120 125  
Tyr Pro Leu His Ser Arg Glu Leu Arg Thr Pro Arg Asn Ala Leu Ala  
130 135 140  
Ala Ile Gly Leu Ile Trp Gly Leu Ala Leu Leu Phe Ser Gly Pro Tyr  
145 150 155 160  
Leu Ser Tyr Tyr Arg Gln Ser Gln Leu Ala Asn Leu Thr Val Cys His  
165 170 175  
Pro Ala Trp Ser Ala Pro Arg Arg Ala Met Asp Leu Cys Thr Phe  
180 185 190  
Val Phe Ser Tyr Leu Leu Pro Val Leu Val Leu Ser Leu Thr Tyr Ala  
195 200 205  
Arg Thr Leu Arg Tyr Leu Trp Arg Thr Val Asp Pro Val Thr Ala Gly  
210 215 220  
Ser Gly Ser Gln Arg Ala Lys Arg Lys Val Thr Arg Met Ile Ile Ile  
225 230 235 240  
Val Ala Val Leu Phe Cys Leu Cys Trp Met Pro His His Ala Leu Ile  
245 250 255  
Leu Cys Val Trp Phe Gly Arg Phe Pro Leu Thr Arg Ala Thr Tyr Ala  
260 265 270  
Leu Arg Ile Leu Ser His Leu Val Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Val Asn  
275 280 285  
Pro Ile Val Tyr Ala Leu Val Ser Lys His Phe Arg Lys Gly Phe Arg  
290 295 300  
Lys Ile Cys Ala Gly Leu Leu Arg Pro Ala Pro Arg Arg Ala Ser Gly  
305 310 315 320

Arg Val Ser Ile Leu Ala Pro Gly Asn His Ser Gly Ser Met Leu Glu

325

330

335

Gln Glu Ser Thr Asp Leu Thr Gln Val Ser Glu Ala Ala Gly Pro Leu

340

345

350

Val Pro Pro Pro Ala Leu Pro Asn Cys Thr Ala Ser Ser Arg Thr Leu

355

360

365

Asp Pro Ala Cys

370

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 370

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 3

Met Ala Asp Ile Gln Asn Ile Ser Leu Asp Ser Pro Gly Ser Val Gly

1

5

10

15

Ala Val Ala Val Pro Val Ile Phe Ala Leu Ile Phe Leu Leu Gly Met

20

25

30

Val Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala Val Leu Leu Gln Pro Gly Pro Ser

35

40

45

Ala Trp Gln Glu Pro Ser Ser Thr Thr Asp Leu Phe Ile Leu Asn Leu

50

55

60

Ala Val Ala Asp Leu Cys Phe Ile Leu Cys Cys Val Pro Phe Gln Ala

65

70

75

80

Ala Ile Tyr Thr Leu Asp Ala Trp Leu Phe Gly Ala Phe Val Cys Lys

85

90

95

Thr Val His Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Met Tyr Ala Ser Ser Phe Thr

100                    105                    110  
Leu Ala Ala Val Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Val Arg His Pro Leu  
115                    120                    125  
Arg Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Arg Asn Ala Arg Ala Ala Val Gly  
130                    135                    140  
Leu Val Trp Leu Leu Ala Ala Leu Phe Ser Ala Pro Tyr Leu Ser Tyr  
145                    150                    155                    160  
Tyr Gly Thr Val Arg Tyr Gly Ala Leu Glu Leu Cys Val Pro Ala Trp  
165                    170                    175  
Glu Asp Ala Arg Arg Ala Leu Asp Val Ala Thr Phe Ala Ala Gly  
180                    185                    190  
Tyr Leu Leu Pro Val Ala Val Val Ser Leu Ala Tyr Gly Arg Thr Leu  
195                    200                    205  
Cys Phe Leu Trp Ala Ala Val Gly Pro Ala Gly Ala Ala Ala Ala Glu  
210                    215                    220  
Ala Arg Arg Arg Ala Thr Gly Arg Ala Gly Arg Ala Met Leu Ala Val  
225                    230                    235                    240  
Ala Ala Leu Tyr Ala Leu Cys Trp Gly Pro His His Ala Leu Ile Leu  
245                    250                    255  
Cys Phe Trp Tyr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Pro Ala Thr Tyr Ala Cys  
260                    265                    270  
Arg Leu Ala Ser His Cys Leu Ala Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro  
275                    280                    285  
Leu Val Tyr Ser Leu Ala Ser Arg His Phe Arg Ala Arg Phe Arg Arg  
290                    295                    300  
Leu Trp Pro Cys Gly Arg Arg His Arg His His His Arg Ala His

305                    310                    315                    320  
Arg Ala Leu Arg Arg Val Gln Pro Ala Ser Ser Gly Pro Ala Gly Tyr  
325                    330                    335  
Pro Gly Asp Ala Arg Pro Arg Gly Trp Ser Met Glu Pro Arg Gly Asp  
340                    345                    350  
Ala Leu Arg Gly Gly Glu Thr Arg Leu Thr Leu Ser Pro Arg Gly  
355                    360                    365  
Pro Gln  
370  
<210> 4  
<211> 1041  
<212> DNA  
<213> Rat  
<400> 4  
ATGGAACCTGG CTCCGGTGAA CCTCAGTGAA GGGATGGGA GCGACCCCTGA ACCTCCAGCG        60  
GAACCCAGGC CGCTCTTCGG CATCGCGTG GAGAACATTCA TCACGCTGGT GGTGTTGGC        120  
CTTATTTCG CGATGGGCGT GCTGGGCAAC AGCCTGGTGA TCACCGTGCT GGCGCGCAGC        180  
AAACCGGGCA AGCCGGCGAG CACCACCAAC CTGTTCATCC TCAACCTGAG CATCGCAGAC        240  
CTGGCCTACC TGCTCTTCTG CATCCCTTTC CAGGCCACCG TGTACGCACT GCCCACCTGG        300  
GTGCTGGCG CCTTCATCTG CAAGTTTATA CACTACTTCT TCACCGTGTC CATGCTCGTG        360  
AGCATCTTCA CCCTGGCCGC GATGTCTGTG GATCGCTATG TGGCCATTGT GCATTCACGG        420  
CGCTCCTCCT CCCTCAGGGT GTCCCGAAC GCGCTGCTGG GCGTGGGCTT CATCTGGCG        480  
CTGTCCATCG CTATGGCCTC GCCGGTGGCC TACTACCAGC GCCTTTTCA TCGGGACAGC        540  
AACCAAACCT TCTGCTGGGA GCACTGGCCC AACCAACTCC ACAAGAAGGC TTACGTGGTG        600  
TGCACCTTCG TCTTTGGTTA CCTTCTGCC TTACTGCTCA TCTGCTTTG CTATGCCAAG        660  
GTTCTCAATC ATCTGCATAA AAAGTTGAAG AACATGTCAA AAAAGTCAGA GGCATCCAAG        720

AAAAAGACTG CACAGACTGT CCTGGTGGTC GTTGTGGTAT TTGGCATATC ATGGCTGCC 780  
CATCATGTCA TCCACCTCTG GGCTGAGTTC GGAGCATTCC CGCTGACCCC AGCTTCCTC 840  
TTCTTCAGAA TCACTGCCA CTGCCTGGCA TACAGCAACT CCTCGGTGAA CCCCCATCATC 900  
TACGCCTTTC TCTCAGAAAA CTTCCGGAAG GCGTACAAGC AAGTGTCAA GTGCCGTGTT 960  
TGCAATGAGT CGCCGCACGG CGATGCTAAA GAAAAGAACC GAATAGATAC CCCGCCCTCC 1020  
ACCAACTGCA CCCACGTGTG A 1041

<210> 5

<211> 1119

<212> DNA

<213> Rat

<400> 5

ATGAATGGCT CCGGCAGCCA GGGCGCGGAG AACACGAGCC AGGAAGGCAG TAGCGGCGGC 60  
TGGCAGCCTG AGGCCGTCTCT TGTACCCCTA TTTTCGCCGC TCATCTTCCT CGTGGGCACC 120  
GTGGGCAACG CGCTGGTGCT GGCGGTGCTG CTGCGCGGCG GCCAGGCGGT CAGCACCAACC 180  
AACCTGTTCA TCCTCAACCT GGGCGTGGCC GACCTGTGTT TCATCCTGTG CTGCGTGCCT 240  
TTCCAGGCCA CCATCTACAC CCTGGACGAC TGGGTGTTCG GCTCGCTGCT CTGCAAGGCT 300  
GTTCAATTCC TCATCTTCT CACTATGCAC GCCAGCAGCT TCACGCTGGC CGCCGTCTCC 360  
CTGGACAGGT ATCTGGCCAT CCGCTACCCG CTGCACTCCC GAGAGTTGCG CACACCTCGA 420  
AACCGCCTGG CCGCCATCGG GCTCATCTGG GGGCTAGCAC TGCTCTTCTC CGGGCCCTAC 480  
CTGAGCTACT ACCGTCAGTC GCAGCTGGCC AACCTGACAG TATGCCACCC AGCATGGAGC 540  
GCACCTCGAC GTCGAGCCAT GGACCTCTGC ACCTTCGTCT TTAGCTACCT GCTGCCAGTG 600  
CTAGTCCTCA GTCTGACCTA TGCGCGTACC CTGCGCTACC TCTGGCGCAC AGTCGACCCG 660  
GTGACTGCAG GCTCAGGTTTC CCAGCGCGCC AAACGCAAGG TGACACGGAT GATCATCATC 720  
GTGGCGGTGC TTTCTGCCT CTGTTGGATG CCCCACCACG CGCTTATCCT CTGCGTGTGG 780  
TTTGGTCGCT TCCCGCTCAC GCGTGCCACT TACGCGTTGC GCATCCTTTC ACACCTAGTT 840  
TCCTATGCCA ACTCCTGTGT CAACCCCATC GTTACGCTC TGGTCTCCAA GCATTTCCGT 900

AAAGGTTCC GCAAAATCTG CGCGGCCCTG CTGCGCCCTG CCCCCGAGGCG AGCTTCGGGC 960  
CGAGTGAGCA TCCTGGCGCC TGGGAACCAT AGTGGCAGCA TGCTGGAACA GGAATCCACA 1020  
GACCTGACAC AGGTGAGCGA GGCAGCCGGG CCCCTTGTCC CACCACCCGC ACTTCCAAC 1080  
TGCACAGCCT CGAGTAGAAC CCTGGATCCG GCTTGTAA 1119  
<210> 6  
<211> 1113  
<212> DNA  
<213> Rat  
<400> 6  
ATGGCTGACA TCCAGAACAT TTCGCTGGAC AGCCCAGGGA GCGTAGGGC TGTGGCAGTG 60  
CCTGTGATCT TTGCCCTCAT CTTCCCTGTTG GGCAATGGTGG GCAATGGGCT GGTGTTGGCT 120  
GTGCTACTGC AGCCTGGCCC AAGTGCCTGG CAGGAGCCAA GCAGTACACAG ATCTCTTC 180  
ATCCTCAACT TGGCCGTGGC CGACCTTTGC TTCATCCTGT GCTGCGTGCC CTTCCAGGCA 240  
GCCATCTACA CACTGGATGC CTGGCTCTT GGGGCTTTCG TGTGCAAGAC GGTACATCTG 300  
CTCATCTACC TCACCATGTA TGCCAGCAGC TTCACCCCTGG CGGCCGTCTC CCTGGACAGG 360  
TACCTGGCTG TGCAGCACCC ACTGCGCTCC AGAGCCCTGC GCACCCCGCG CAACGCGCGC 420  
GCCGCCGTGG GGCTCGTGTG GCTGCTGGCG GCTCTCTTT CCGCGCCCTA CCTAAGCTAT 480  
TACGGCACGG TGCCTACGG CGCGCTCGAG CTCTGCGTGC CCCGTTGGGA GGACGGCCGG 540  
CGGCGCGCGC TGGACGTGGC CACCTTCGCC GCGGGCTACC TGCTGCCGGT GGCGTGGTG 600  
AGCCTGGCCT ACGGACGCAC GCTATGTTTC CTATGGGCCG CGTGCGGTCC CGCGGGCGCG 660  
GCGGCAGCAG AGGCGCGCAG ACGGGCGACC GGCCGGCCGG GACGCGCCAT GCTGGCAGTG 720  
GCCGCGCTCT ACGCGCTTG CTGGGGCCCG CACCACGCGC TCATCCTCTG CTTCTGGTAC 780  
GGCCGCTTCG CCTTCAGCCC GGCCACCTAC GCCTGTCGCC TGGCCTCGCA CTGCCCTGCC 840  
TACGCCAACT CCTGCCTTAA CCCGCTCGTC TACTCGCTCG CCTCGCGCCA CTTCCGCGCG 900  
CGCTTCCGCC GCCTGTGGCC CTGCGGCCGT CGCCGCCACC GCCACCACCA CCGCGCTCAT 960  
CGAGCCCTCC GTGCGTCCA GCCGGCGTCT TCAGGGCCCCG CCAGTTATCC CGGCGACGCC 1020

AGGCCTCGTG GTTGGAGTAT GGAGCCCAGA GGGGATGCTC TGCCTGGTGG TGGAGAGACT 1080

AGACTAACCC TGTCCCCAG GGGACCTCAA TAA 1113

<210> 7

<211> 29

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 7

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro His Ala Ile

1 5 10 15

Asp Asn His Arg Ser Phe His Asp Lys Tyr Gly Leu Ala

20 25

<210> 8

<211> 123

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 8

Met Pro Arg Gly Cys Ala Leu Leu Leu Ala Ser Leu Leu Ala Ser

1 5 10 15

Ala Leu Ser Ala Thr Leu Gly Leu Gly Ser Pro Val Lys Glu Lys Arg

20 25 30

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro His Ala Ile

35 40 45

Asp Asn His Arg Ser Phe His Asp Lys Tyr Gly Leu Ala Gly Lys Arg

50 55 60

Glu Leu Glu Pro Glu Asp Glu Ala Arg Pro Gly Gly Phe Asp Arg Leu

65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Lys Ala Ile Arg Thr Ile Met Glu Phe Leu Ala Phe

85

90

95

Leu His Leu Lys Glu Ala Gly Ala Leu Gly Arg Leu Pro Gly Leu Pro

100

105

110

Ser Ala Ala Ser Ser Glu Asp Ala Gly Gln Ser

115

120

<210> 9

<211> 38

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 9

Leu Gly Ser Pro Val Lys Glu Lys Arg Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala

1

5

10

15

Gly Tyr Leu Leu Gly Pro His Ala Ile Asp Asn His Arg Ser Phe His

20

25

30

Asp Lys Tyr Gly Leu Ala

35

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 10

Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro His Ala Ile Asp Asn His Arg

1

5

10

15

Ser Phe His Asp Lys Tyr Gly Leu Ala

20

25

<210> 11

<211> 34

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 11

Ala Pro Val His Arg Gly Arg Gly Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly

1

5

10

15

Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu His Pro Pro ser Xaa Ala Glu Gly Gly

20

25

30

Gly Lys

<210> 12

<211> 32

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 12

Ala Pro Val His Arg Gly Arg Gly Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly

1

5

10

15

Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu His Pro Pro ser Xaa Ala Glu Gly Gly

20

25

30

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 13

Ala Pro Val His Arg Gly Arg Gly Gly

1

5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 14

Thr Leu Asn Ser Ala Gly

1 5

<210> 15

<211> 27

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 15

Leu Leu Gly Pro Val Leu His Pro Pro Ser Xaa Ala Glu Gly Gly Gly

1 5 10 15

Lys Gly Lys Thr Ala Leu Gly Ile Leu Asp Leu

20 25

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 16

Xaa Ala Ile Asp Gly Leu Pro Tyr Pro Gln Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 44

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 17

Ala Pro Val His Arg Gly Arg Gly Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly

1

5

10

15

Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu His Pro Pro ser Xaa Ala Glu Gly Gly

20

25

30

Gly Lys Gly Lys Thr Ala Leu Gly Ile Leu Asp Leu

35

40

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artifical Sequence

<220>

<223>

<400> 18

GTCGACATGA ATGGCTCCGG CAGCCAG 27

<210> 19

<211> 32

<212> DNA

<213> Artifical Sequence

<220>

<223>

<400> 19

ACTAGTTAA CAAGCCGGAT CCAGGGTTCT AC 32

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 20

CAYMGNNGGIM GNGGIGGSTG GAC 23

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 21

GGHTGGACNC TNAAYAGYGC 20

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 22

ATICCNAGIG CNGTYTTICC YTT 23

<210> 23

<211> 98

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 23

GGCTGGACTT TAAATAGTGC TGGTTACCTC CTGGGTCCCG TACTCCATCC GCCCTCCAGG 60

GCTGAAGGAG GCGGGAAGGG CAAAACAGCC CTGGGCAT 98

<210> 24

<211> 98

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 24

GGTTGGACTT TGAACAGTGC TGGTTACCTC CTGGGTCCCG TACTCCATCC GCCCTCCAGG 60

GCTGAAGGAG GCGGGAAGGG CAAAACCGCC CTAGGCAT 98

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 25

GGHTGGACNC TNAAYAGYGC 20

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 26

ATDCCBAGGG CDGTTTGCC CTT 23

<210> 27

<211> 974

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 27

TTCAGCCTCA AGCACCCATC CCTCCAGCCC TCAGATGGCT CTGACTGTCC CTCTGATCGT 60  
TCTTGCAGTC CTGCTCAGCC TGATGGAGTC TCCAGCCTCT GCTCCGGTCC ACAGGGGGCG 120  
AGGAGGCTGG ACCCTCAACA GTGCTGGTTA CCTCCTGGGT CCCGTACTCC ATCCGCCCTC 180  
CAGGGCTGAA GGAGGCAGGA AGGGGAAGAC AGCCCTCGGG ATCCTGGACC TGTGGAAGGC 240  
CATTGATGGG CTCCCCTATC CCCAGTCTCA GTTGGCCTCC AAGAGGAGTC TGGGGGAGAC 300  
TTTCGCCAAA CCAGACTCTG GAGTAACATT TGTGGAGTT CCTGACGTGG TGCGTGAA 360  
ACGAATCCGA CCAGGAACTA CGAGGTTCA GATCTAGGCA AGCTCTGCAA GAACGTTCCA 420  
AAGGAGAAAG ATGCCTTGCC GTCATATATG CCTCCAAACT TCCGCTCCAA ACTTCCCCCC 480  
CGTCTCCAGA TCCTCCTGAA ACCCTAGGTA GACACCCTCT ACTGAGACTG GGAGCCTGAA 540  
AGTAAATCCC CAAATCCCAG GTAGAAAATG GGGAGCATT GAAGAATTAT TCTCAAAAGT 600  
CCCCGGACTG TGCCAGGTTT CACTGATCCC CCCCTCCCCC TTGGACTAAG TGTAAAGCGA 660  
TGTAAACCAA CTCAAGAATA ATTCTGAAAC CATTCAAGGAG ATCCGGAGAG GAATCGGGAA 720  
ATACTCCTGC AGTGCATTAA AAGTAACTGG GTCCTATGCA ACATGAGCCA TTGGATCATA 780  
CAATATTGAT ATCCCTTCTA ACACGGAGGT TCTAGGGTGT CTCAGCTGGA AAAGATTCTT 840  
CAGAGTAGCA TGCTTGCCTT ACCCCATCCT TCTCACCCCA CCCCAGGCCT CCTCCAGCAG 900  
AAAGGACGAG AGGCCATCTG GAGCAGAGCA GAGAGAATAA ATATTCCCTT TCAAAGAAAA 960  
AAAAAAAAAA AAAA 974

<210> 28

<211> 1007

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 28

GGAACGAGCT	GGGGAGAGCT	GCCGACTGCA	GGCAGCCTTC	TTCAGCCTCA	AGCACCCATC	60
CCTCCAGCCC	TCAGATGGCT	CTGACTGTCC	CTCTGATCGT	TCTTGCAGTC	CTGCTCAGCC	120
TGATGGAGTC	TCCAGCCTCT	GCTCCGGTCC	ACAGGGGGCG	AGGAGGCTGG	ACCCTCAACA	180
GTGCTGGTTA	CCTCCTGGGT	CCCGTACTCC	ATCCGCCCTC	CAGGGCTGAA	GGAGGCAGGA	240
AGGGGAAGAC	AGCCCTCGGG	ATCCTGGACC	TGTGGAAGGC	CATTGATGGG	CTCCCCATAC	300
CCCAGTCTCA	GTTGGCCTCC	AAGAGGAGTC	TGGGGAGACT	TTCGCCAAAC	CAGACTCTGG	360
AGTAACATTT	GTTGGAGTTC	CTGACGTGGT	GCCGTGGAAA	CGAATCCGAC	CAGGAACCTAC	420
GAGGTTTCAG	ATCTAGGCAA	GCTCTGCAAG	AACGTTCAA	AGGAGAAAGA	TGCCTTGTG	480
TCATATATGC	CTCCAAACTT	CCGCTCCAAA	CTTCCCCCC	GTCCCCAGAT	CCTCCTGAAA	540
CCCTAGGTAG	ACACCCCTCTA	CTGAGACTGG	GAGCCTGAAA	GTAAATCCCC	AAATCCCAGG	600
TAGAAAATGG	GGAGCATTG	AAGAATTATT	CTCAAAAGTC	CCCGGACTGT	GCCAGGTTTC	660
ACTGATCCCC	CCCCCCCCCC	TCCTGGACT	AAGTGTAAAG	CGATGTAAAC	CAACTCAAGA	720
ATAATTCTGA	AACCATTCTAG	GAGATCCGGA	GAGGAATCGG	GAAATACTCC	TGCAGTGCAT	780
TTAAAGTAAC	TGGGTCTTAT	GCAACATGAG	CCATTGGATC	ATACAATATT	GATATCCCTT	840
CTAACACGGA	GGTTCTAGGG	TGTCTCAGCT	GGAAAAGATT	CTTCAGAGTA	GCATGCTTGC	900
CTTACCCCAT	CCTCTCACC	CCACCCGAG	CCTCCTCCAG	CAGAAAGGAC	GAGAGGCCAT	960
CTGGAGCAGA	GCAGAGAGAA	TAAATATTCC	CTTCAAAGA	AAAAAAA		1007

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 29

Met Ala Leu Thr Val Pro Leu Ile Val Leu Ala Val Leu Leu Ser Leu

1

5

10

15

Met Glu Ser Pro Ala Ser Ala Pro Val His Arg Gly Arg Gly Gly Trp

20

25

30

Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu His Pro Pro

35

40

45

Ser Arg Ala Glu Gly Gly Lys Gly Lys Thr Ala Leu Gly Ile Leu

50

55

60

Asp Leu Trp Lys Ala Ile Asp Gly Leu Pro Tyr Pro Gln Ser Gln Leu

65

70

75

80

Ala Ser Lys Arg Ser Leu Gly Glu Thr Phe Ala Lys Pro Asp Ser Gly

85

90

95

Val Thr Phe Val Gly Val Pro Asp Val Val Pro Trp Lys Arg Ile Arg

100

105

110

Pro Gly Thr Thr Arg Phe Gln Ile

115

120

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 96

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Porcine

&lt;400&gt; 30

Met Ala Leu Thr Val Pro Leu Ile Val Leu Ala Val Leu Leu Ser Leu

1

5

10

15

Met Glu Ser Pro Ala Ser Ala Pro Val His Arg Gly Arg Gly Gly Trp

20

25

30

Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu His Pro Pro

35

40

45

Ser Arg Ala Glu Gly Gly Lys Gly Lys Thr Ala Leu Gly Ile Leu

50

55

60

Asp Leu Trp Lys Ala Ile Asp Gly Leu Pro Tyr Pro Gln Ser Gln Leu

65

70

75

80

Ala Ser Lys Arg Ser Leu Gly Arg Leu Ser Pro Asn Gln Thr Leu Glu

85

90

95

<210> 31

<211> 60

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 31

Ala Pro Val His Arg Gly Arg Gly Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly

1

5

10

15

Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu His Pro Pro Ser Arg Ala Glu Gly Gly

20

25

30

Gly Lys Gly Lys Thr Ala Leu Gly Ile Leu Asp Leu Trp Lys Ala Ile

35

40

45

Asp Gly Leu Pro Tyr Pro Gln Ser Gln Leu Ala Ser

50

55

60

<210> 32

<211> 180

<212> DNA

<213> Porcine

<400> 32

GCTCCGGTCC ACACGGGGCG AGGAGGCTGG ACCCTCAACA GTGCTGGTTA CCTCCTGGGT 60

CCCGTACTCC ATCCGCCCTC CAGGGCTGAA GGAGGCAGGA AGGGGAAGAC AGCCCTCGGG 120

ATCCTGGACC TGTGGAAGGC CATTGATGGG CTCCCCATAC CCCAGTCTCA GTTGGCCTCC 180

<210> 33

<211> 60

<212> PRT

<213> Rat

<400> 33

Ala Pro Ala His Arg Gly Arg Gly Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly

1

5

10

15

Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu His Leu Ser Ser Lys Ala Asn Gln Gly

20

25

30

Arg Lys Thr Asp Ser Ala Leu Glu Ile Leu Asp Leu Trp Lys Ala Ile

35

40

45

Asp Gly Leu Pro Tyr Ser Arg Ser Pro Arg Met Thr

50

55

60

<210> 34

<211> 60

<212> PRT

<213> Human

<400> 34

Ala Pro Ala His Arg Gly Arg Gly Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly

1

5

10

15

Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu His Leu Pro Gln Met Gly Asp Gln Asp

20

25

30

Gly Lys Arg Glu Thr Ala Leu Glu Ile Leu Asp Leu Trp Lys Ala Ile

35

40

45

Asp Gly Leu Pro Tyr Ser His Pro Pro Gln Pro Ser

50

55

60

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Human, Rat

<400> 35

Ala Pro Ala His Arg Gly Arg Gly Gly

1 5

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> Human, Rat

<400> 36

Ala Pro Ala His Arg Gly Arg Gly Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly

1 5 10 15

Tyr Leu Leu Gly Pro

20

<210> 37

<211> 123

<212> PRT

<213> Rat

<400> 37

Met Pro Cys Phe Ser Ser Ser Arg Met Ala Cys Ser Lys His Leu Val

1 5 10 15

Leu Phe Leu Thr Ile Leu Leu Ser Leu Ala Glu Thr Pro Asp Ser Ala

20 25 30

Pro Ala His Arg Gly Arg Gly Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr

35	40	45
Leu Leu Gly Pro Val Leu His Leu Ser Ser Lys Ala Asn Gln Gly Arg		
50	55	60
Lys Thr Asp Ser Ala Leu Glu Ile Leu Asp Leu Trp Lys Ala Ile Asp		
65	70	75
Gly Leu Pro Tyr Ser Arg Ser Pro Arg Met Thr Lys Arg Ser Met Gly		
85	90	95
Glu Thr Phe Val Lys Pro Arg Thr Gly Asp Leu Arg Ile Val Asp Lys		
100	105	110
Asn Val Pro Asp Glu Glu Ala Thr Leu Asn Leu		
115	120	

<210> 38

<211> 116

<212> PRT

213 Human

<400> 38

Met Ala Pro Pro Ser Val Pro Leu Val Leu Leu Leu Val Leu Leu Leu			
1	5	10	15
Ser Leu Ala Glu Thr Pro Ala Ser Ala Pro Ala His Arg Gly Arg Gly			
20	25	30	
Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu His			

35	40	45
Leu Pro Gln Met Gly Asp Gln Asp Gly Lys Arg Glu Thr Ala Leu Glu		
50	55	60
Ile Leu Asp Leu Trp Lys Ala Ile Asp Gly Leu Pro Tyr Ser His Pro		
65	70	75
80		

Pro Gln Pro Ser Lys Arg Asn Val Met Glu Thr Phe Ala Lys Pro Glu

85

90

95

Ile Gly Asp Leu Gly Met Leu Ser Met Lys Ile Pro Lys Glu Glu Asp

100

105

110

Val Leu Lys Ser

115

<210> 39

<211> 180

<212> DNA

<213> Rat

<400> 39

GCACCTGCTC ACAGGGGACG AGGAGGCTGG ACCCTCAATA GTGCTGGTTA CCTCCTGGGT 60

CCTGTCCTCC ACCTTTCCTC AAAGGCCAAC CAGGGCAGGA AGACAGACTC AGCTCTTGAG 120

ATCCTAGACC TGTGGAAGGC CATAGATGGG CTCCCTTATT CCCGCTCTCC AAGGATGACC 180

<210> 40

<211> 180

<212> DNA

<213> Human

<400> 40

GCACCTGCC ACCGGGGACG AGGAGGCTGG ACCCTCAATA GTGCTGGCTA CCTTCTGGGT 60

CCCGTCCCTCC ACCTTCCCCA AATGGGTGAC CAAGACGGAA AGAGGGAGAC AGCCCTTGAG 120

ATCCTAGACC TGTGGAAGGC CATCGATGGG CTCCCCTACT CCCACCCCTCC ACAGCCCTCC 180

<210> 41

<211> 695

<212> DNA

<213> Rat

<400> 41

AGGACAACTG GGATTACAGA TGTGCATCCC TGCAACCGGC TGCCACACAA GTTCTGGGAT 60  
CTGAACTCCT GGCCTCAAAC TTGCCAGCAT TCCTTAGCTG TATGCCGTGC TTTTCCAGTT 120  
CCAGGATGGC CTGCTCCAAG CATCTGGTCC TCTTCCTCAC CATCTTGCTA AGCCTCGCAG 180  
AACACCCAGA CTCTGCACCT GCTCACAGGG GACGAGGAGG CTGGACCCTC AATAGTGCTG 240  
GTTACCTCCT GGGTCCTGTC CTCCACCTTT CCTCAAAGGC CAACCAGGGC AGGAAGACAG 300  
ACTCAGCTCT TGAGATCCTA GACCTGTGGA AGGCCATAGA TGGGCTCCCT TATTCCCGCT 360  
CTCCAAGGAT GACCAAAAGG TCAATGGGAG AACAGTTGT CAAGCCGAGG ACTGGAGATC 420  
TGCGCATAGT GGACAAGAAT GTTCCGGATG AAGAAGCCAC CCTGAACCTTA TAGAGAGTTA 480  
GCCCTAGCTC ACTCCTACGT TTCCAGCTCA CCGCCTCTCC CCCCACCCCC GCCCCCAGAA 540  
GCGCTCTGAA CACCCTTCT AAGTCTAAGA CCTTACAACAT ATTCCCTA ATCTCACTAA 600  
GACATGTTGT GATATTTAAA GAGTTATTCT GCCCAGCTCC GAAAAAAA AAAAAAAA 660  
AAGAGTTATT CTGACGTAAA AAAAAAAA AAAAA 695

<210> 42

<211> 473

<212> DNA

<213> Human

<400> 42

GAGGAGCCAG AGAGAGCTGC GGAGAGCTGC CAGCTGCACC GGGCGTGTTC CGCAGCTGTA 60  
GGCACCTGTC GTCCTGCCCT CGATGGCTCC TCCCTCCGTC CCCCTGGTCC TCCTCCTCGT 120  
CCTCTTGCTG AGCCTGGCAG AGACTCCAGC ATCCGCACCT GCCCACCGGG GACGAGGAGG 180  
CTGGACCCCTC AATAGTGCTG GCTACCTTCT GGGTCCCCTC CTCCACCTTC CCCAAATGGG 240  
TGACCAAGAC GGAAAGAGGG AGACAGCCCT TGAGATCCTA GACCTGTGGA AGGCCATCGA 300  
TGGGCTCCCC TACTCCCACC CTCCACAGCC CTCCAAGAGG AATGTGATGG AGACGTTGC 360  
CAAACCAGAG ATTGGAGATC TGGGCATGCT CAGCATGAAA ATTCCCAAGG AGGAAGATGT 420  
CCTGAAGTCA TAGATGTCTT CAAATCCCTG TTCCTATCCT TCTTCTCCAG CTC 473

<210> 43

<211> 30

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 43

Ala Pro Val His Arg Gly Arg Gly Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly

1

5

10

15

Tyr Leu Leu Gly Pro Val Leu His Pro Pro Ser Arg Ala Glu

20

25

30

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 44

Cys Ala Pro Ala His Arg Gly Arg Gly Gly

1

5

10

<210> 45

<211> 356

<212> DNA

<213> Rat

<400> 45

ATGGCTCTGA CTGTCCCTCT GATCGTTCTT GCAGTCCTGC TCAGCCTGAT GGAGTCTCCA 60

GCCTCTGCTC CGGTCCACAG GGGGGAGGA GGCTGGACCC TCAACAGTGC TGGTTACCTC 120

CTGGGTCCCG TACTCCATCC GCCCTCCAGG GCTGAAGGAG GCAGGAAGGG GAAGACAGCC 180

CTCGGGATCC TGGACCTGTG GAAGGCCATT GATGGGCTCC CCTATCCCCA GTCTCAGTTG 240

GCCTCCAAGA GGAGTCTGGG GGAGACTTTC GCCAAACCAG ACTCTGGAGT AACATTGTT 300

GGAGTTCTCG ACGTGGTGCC GTGGAAACGA ATCCGACCAG GAACTACGAG GTTTCA 356

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 46

ATGGCTCTGA CTGTCCCTCT GATCGTTCT

19

<210> 47

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 47

TGAAACCTCG TAGTTCCCTGG TCGGATTCTG

19

<210> 48

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 48

AGGCTGGACC CTCAATAGTG CTGGTTAC

18

<210> 49

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 49

CCATCTATGG CCTTCCACAG GTCTAGGA

18

<210> 50

<211> 126

<212> DNA

<213> Human

<400> 50

AGGCTGGACC CTCAATAGTG CTGGTTACCT TCTGGGTCCC GTCCTCCACC TTCCCCAAAT 60

GGGTGACCAA GACGGAAAGA GGGAGACAGC CCTTGAGATC CTAGACCTGT GGAAGGCCAT 120

AGATGG

126

<210> 51

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 51

CAAATGGGTG ACCAAGACGG AAAGAGGG

18

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> Artifical Sequence

<220>

<223>

<400> 52

GGTCTAGGAT CTCAAGGGCT GTCTCCCT

18

<210> 53

<211> 16

<212> DNA

<213> Artifical Sequence

<220>

<223>

<400> 53

GAGGAGCCAG AGAGAGCTGC GGAGAG

16

<210> 54

<211> 18

<212> DNA

<213> Artifical Sequence

<220>

<223>

<400> 54

GAGCTGGAGA AGAAGGATAG GAACAGGG

18

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Artifical Sequence

<220>

<223>

<400> 55

AGCATATGGC TCCGGTCCAC AGG

23

<210> 56

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 56

CTGGATCCTC AGGAGGCCAA CTGAGAC

27

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 57

CAGCCCTCGG CATCCTGGAC C

21

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 58

GGTCCAGGAT GCCGAGGGCT G

21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 59

CTAGACATAT GCCAGCATTG C

21

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 60

TCGGGCAATG CTGGCATATG T

21

<210> 61

<211> 29

<212> PRT

<213> Rat

<400> 61

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro His Ala Ile

1

5

10

15

Asp Asn His Arg Ser Phe Ser Asp Lys His Gly Leu Thr

20

25

29

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01482

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1<sup>6</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12P21/02, C07K16/18, A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1<sup>6</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12P21/02, C07K16/18, A61K38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 06-507629, A (Aktiebolaget Astra), 1 September, 1994 (01. 09. 94) & EP, 514361, A & WO, 92/20709, A & US, 5576296, A	1-22
A	WO, 92/12997, A1 (The General Hospital Corporation), 6 August, 1992 (06. 08. 92) (Family: none)	1-22
A	Endocrinology Vol. 136 p.3079-3086 (1995) Chartrel N. et al.	1-22
A	FEBS LETT. Vol. 288 p.151-153 (1991) Norberg A. et al.	1-22

 Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 June, 1999 (18. 06. 99)Date of mailing of the international search report  
29 June, 1999 (29. 06. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl° C07K 14/47, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/18,  
A61K 38/17

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl° C07K 14/47, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/18,  
A61K 38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GenSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 06-507629, A (アクチエボラゲット・アストラ) 1.9月.1994 (01.09.94) & EP, 514361, A & WO, 92/20709, A & US, 5576296, A	1-22
A	WO, 92/12997, A1 (The General Hospital Corporation) 6.8月.1992 (06.08.92) パテントファミリーなし	1-22
A	Endocrinology Vol. 136 p. 3079-3086 (1995) Chartrel N. et al.	1-22

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

18. 06. 99

## 国際調査報告の発送日

29.06.99

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官(権限のある職員)

新見 浩一

4N 9162

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/01482

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	FEBS LETT. Vol. 288 p. 151-153 (1991) Norberg A. et al.	1 - 2 2

様式PCT/ISA/210(第2ページの続き)(1998年7月)

